

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz
(Prof.Dr.K.H. Bäßler)

Tierversuche zur Eignung von DL-Glycerin-3-phosphat als
Lieferant von anorganischem Phosphat im Rahmen der paren-
teralen Ernährung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt

von

Wieland Hassinger

aus

Bad Bergzabern

Mainz 1975

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz
(Prof.Dr.K.H. Bäßler)

Tierversuche zur Eignung von DL-Glycerin-3-phosphat als
Lieferant von anorganischem Phosphat im Rahmen der paren-
teralen Ernährung



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt

von

Wieland Hassinger

aus

Bad Bergzabern

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Prof.Dr.Dr.J.Grote

Referent: Prof.Dr. H.H.Böglér

Korreferent: Prof.Dr. C.H.Hammar

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1975

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

Verhalten des anorganischen Phosphates und der Adenosinnucleotide unter Kohlenhydratinfusionen	1
Klinische Sekundäreffekte und Folgen der Hypophosphatämie	5
Phosphatsubstitution mit anorganischen Phosphatverbindungen und ihre Konsequenzen	6

Problemstellung	8
-----------------	---

Material und Methode

I. Material	9
-------------	---

II. Methoden	9
--------------	---

1. Vorbereitung und Probengewinnung von biologischem Material bei Infusions- und Stoßinjektionsversuchen bei Ratten	9
a. Vorbereitung der Versuchstiere	9
b. Blut- und Plasmagewinnung für in vitro-Versuche	10
c. Blutprobengewinnung bei Injektions- und Infusionsversuchen	10
d. Harnprobengewinnung	10
e. Leberprobengewinnung	10
2. Bestimmungsmethoden	11
a. Bestimmung des anorganischen Phosphates in Blut, Harn, Leber und in vitro-Ansätzen	11
b. Bestimmung von Gesamtphosphat in Blut, Harn, Leber und in vitro-Ansätzen	11
c. Bestimmung von L-Glycerin-3-phosphat und Glycerin in Blut, Harn und Leber	11
d. Bestimmung von Lactat in der Leber	12
e. Bestimmung von ATP in der Leber	12
f. Bestimmung von Pyruvat, ADP und AMP in der Leber	13

g. Bestimmung von Glucose und Fructose im gekoppelten optischen Test im Blut	13
h. Blutglucosebestimmung nach der GOD-Methode	14
3. Statistische Auswertung der Meßergebnisse	14
Ergebnisse	16
I. Intravenöse Stoßbelastungen mit Glycerin-3-phosphat und Fructose	16
1. Anorganisches Phosphat im Blut nach Stoßbelastung	16
2. Phosphatfraktionen der Leber nach Stoßbelastungen	18
II. In vitro-Versuche zur Spaltung von Phosphorsäureestern	19
III. Intravenöse Dauerinfusionen mit DL-Glycerin-3-phosphat und Fructose	22
1. 2-Stundeninfusionen mit hohen Fructosedosen	22
Versuchsreihe A	22
Ergebnisse	23
Die Konzentration der Fructose im Blut	25
Versuchsreihe B	25
III. 2. 6-Stunden-Dauerinfusionen mit Fructose und DL-Glycerin-3-phosphat	28
2.1. Blutbefunde	29
2.2. Harnbefunde	30
2.3. Metabolitgehalte der Leber	32
Diskussion	33
A. I. Ausgleich des anorganischen Phosphates im Blut	33
II. Ausgleich des anorganischen Phosphates in der Leber	34

III. Einfluß des Glycerin-3-phosphates auf den Adenosinnucleotidgehalt der Leber	34
IV. Einfluß des Glycerin-3-phosphates auf Lactat und Pyruvat in der Leber und auf die Blutglucosekonzentration	36
E. I. Intravasale Spaltung der organischen Phosphorsäureester	37
II. Spaltung der organischen Phosphorsäureester durch unspezifische Phosphatasen des Plasmas	37
C. Zur Toxizität des Glycerin-3-phosphates	39
Zusammenfassung	39



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554413_0088

Tierversuche zur Eignung von DL-Glycerin-3-phosphat als
Lieferant von anorganischem Phosphat im Rahmen der paren-
teralen Ernährung

Einleitung

Bei der parenteralen Zufuhr von Kohlenhydraten und Polyalkoholen kann eine Abnahme des anorganischen Phosphats im Serum beobachtet werden, deren Ausmaß von der Dosis pro Zeit und von der Art des Substrats abhängt.

Dadurch kann es - wie verschiedene Autoren berichten - zu schweren klinischen Symptomen kommen, die unter dem Begriff des "hyperalimentation syndrome" zusammengefaßt werden und deren Ursache hauptsächlich in der Verarmung des Blutes und der Gewebe an anorganischem Phosphat gesehen wird. Daneben findet sich eine Verminderung des ATP und der Adenosinnucleotide in den Geweben und ein Anstieg des Harnsäurespiegels im Blut.

In den Arbeiten von Mäenpää (1) und Raivio et al. (2) wird dargestellt, daß es bei Ratten nach Injektion von 1 mMol Fructose im Stoß binnen 2 bis 5 Minuten zu einem excessiven Abfallen des Gehaltes der Leber an anorganischem Phosphat, ATP und der gesamten Adenosinnucleotide kommt, während nach etwas längerer Latenz der Harnsäure- und Allantoinspiegel im Plasma stark ansteigt (1). Ausführlichere Untersuchungen zeigten das Verhalten der Adenosinnucleotide des anorganischen Phosphates in der Leber unter Stoßbelastung mit Fructose und mit anderen Zuckern bzw. Zuckeraustauschstoffen (2). Stoßbelastung mit Fructose verminderte dabei am deutlichsten den Gehalt der Leber an Adenosinnucleotiden und anorganischem Phosphat. Bereits nach 5 Minuten hatte das Leber-ATP einen Tiefpunkt erreicht um danach wieder allmählich anzusteigen. Am Ende des

Untersuchungszeitraumes von 30 Minuten war der Gehalt der Leber an ATP noch nicht annähernd ausgeglichen. Auch in Niere und Herzmuskel wurde unter diesen Bedingungen ein verminderter Gehalt an ATP und anorganischem Phosphat festgestellt. Das anorganische Phosphat in der Leber verminderte sich zunächst analog dem ATP und der Summe der Adenosinnucleotide, um dann stark anzusteigen, wobei bereits nach 20 Minuten die Kontrollwerte weit übertroffen wurden. Nach den Angaben der Autoren war das Ausmaß der Verminderung an ATP und anorganischem Phosphat nach Fructose abhängig von der Dosierung, jedoch wurde bei Steigerung der Dosis über 1 mMol pro Ratte, was bei den zugrundegelegten Rattengewichten von 150 bis 200 g einer Zufuhr von 0,9 bis 1,2 g/kg Körpergewicht entspricht, keine weitere Senkung gefunden.

Brinkrolf und Bäßler (3) konnten diese Befunde für ATP, die Summe der Adenosinnucleotide und das anorganische Phosphat in der Leber unter Stoßbelastung mit 1 mMol Fructose bestätigen und für Sorbit und ein Gemisch aus Fructose, Glucose und Xylit ähnliche Befunde erheben, während es unter Belastung mit Glucose bzw. Xylit lediglich zu einem Abfall des Leber-ATP kam. Sie konnten aber gleichzeitig zeigen, daß Fructose selbst unter relativ hoher Dosierung von $1,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ unter den Bedingungen einer Dauerinfusion nur einen mäßiggradigen Abfall des ATP- und Gesamtadenosinnucleotidgehaltes in der Leber verursacht. Dies konnte auch für Sorbit, nicht dagegen für Xylit und Glucose nachgewiesen werden. Woods et al. (4) kamen an der perfundierten Rattenleber zu ähnlichen Ergebnissen, ebenso Bode et al. (5), sowohl an der normalen als auch der regenerierenden Rattenleber. Analog dazu fanden Bode et al. (6) nach 30-minütiger Infusion von 500 ml 10%iger Fructoselösung eine signifikante Verminderung der Leberadenosinnucleotide insgesamt sowie des ATP und des ADP beim Menschen, während unter gleichen Bedingungen Glucose diesen Effekt nicht hervorrief.

Über den Einfluß von Fructose auf den Spiegel des anorganischen Phosphates im Blut berichten Perheentupa und Raivio (7) wie auch Froesch et al. (8) bei Patienten mit hereditärer Fructoseintoleranz. Perheentupa und Raivio fanden bei diesen Patienten bereits nach oraler Fructosebelastung eine Senkung des anorganischen Phosphatgehaltes im Blut. Froesch et al. bestätigten diese Befunde und fanden bei Patienten mit hereditärer Fructoseintoleranz eine verstärkte und verlängerte Verminderung des Phosphatspiegels im Blut im Vergleich zu Normalpersonen, bei denen es ebenfalls zu einer Senkung kam. Heuckenkamp et al. (9) beschrieben eine Herabsetzung des anorganischen Phosphats im Blut nach i.v.-Applikation von $1,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Fructose als Infusion über 4 bis 5 Stunden sowohl bei gesunden Normalpersonen als auch bei Gichtkranken. Eine Senkung des anorganischen Phosphatgehaltes des Blutes wird jedoch nicht nur bei Applikation von Fructose oder Zuckeraustauschstoffen beobachtet, sondern auch bei Belastung mit Glucose. So fanden Haacke et al. (10) bei der Durchführung des i.v.-Glucosetoleranztests und des i.v.-Glucose-Cortisol-Toleranztests bei gesunden Normalpersonen wie auch bei Patienten mit latentem oder manifestem Diabetes mellitus einen verminderten Gehalt des Blutes an anorganischem Phosphat. Corredor et al. (11) beschrieben eine deutliche Senkung des anorganischen Phosphates im Blut nach oraler Glucosebelastung bei fettsüchtigen Patienten unter Nulldiät. Gegenüber gesunden Normalpersonen war bei diesen Probanden der Serumphosphatabfall verstärkt. Bei einem Teil der Patienten, die unter Nulldiät standen, war neben der Obesitas eine Glucoseintoleranz festzustellen. Die Verminderung des anorganischen Serumphosphates infolge der Glucosezufuhr wurde von den Autoren dabei einem gesteigerten Verbrauch an anorganischem Phosphat aufgrund der verstärkt ablaufenden Glykolyse mit Anhäufung phosphorylierter Zwischenprodukte zugeschrieben. Bei Diabetes mellitus mit verminderter Glykolyse und bei Erkrankungen mit gesteigerter Glykogenbildung dagegen fanden die Autoren einen verminderten und verzögerten Abfall des anor-

ganischen Serumphosphates. Dies konnte zum Teil von Haacke et al. (10) bestätigt werden, die zwar bei Diabetikern unter Glucosebelastung eine ebenso deutliche Verminderung des anorganischen Phosphates im Blut fanden wie bei Gesunden, jedoch trat der Phosphatabfall im Blut bei den Diabetikern verzögert auf und der tiefste Phosphatwert wurde zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt erreicht als bei den gesunden Probanden. Ähnliche Befunde wie die von Corredor et al. bei fettsüchtigen Patienten im Hungerzustand konnten auch bei chronisch unterernährten Patienten und bei hungernden Hunden und Ratten unter parenteraler Ernährung mit Glucose erhoben werden (12). Es kam dabei unter hochdosierter Zufuhr von Glucose zu einer deutlichen Verminderung des anorganischen Phosphates im Blut. In der Folge entwickelten die Patienten wie auch die Versuchstiere zentralnervöse Symptome, die rasch ins Koma und schließlich zum Tode führten. Durch gleichzeitige Zufuhr von Phosphaten - leider fehlen die Angaben um welche Substanzen es sich dabei handelte - konnte zwar der Spiegel des anorganischen Phosphates im Blut normalisiert werden, jedoch änderte der Ausgleich des Serumphosphatspiegels nichts an der Prognose der Patienten oder der Versuchstiere hinsichtlich des klinischen Verlaufes oder der Mortalität. Auch aus den übrigen Parametern konnten die Autoren keinen Hinweis für die Ursache des fatalen klinischen Verlaufes finden.

Diesen von verschiedenen Autoren unter den verschiedensten Gesichtspunkten erhobenen Befunden ist gemeinsam, daß der Spiegel des anorganischen Phosphates im Blut und in der Leber, der Adenosinnucleotidgehalt der Leber und anderer Organe dann am deutlichsten vermindert war, wenn Kohlenhydrate einem Organismus zugeführt wurden, der sich in einer extremen Stoffwechselsituation (z.B. Hungerzustand) befand oder wenn Kohlenhydrate zugeführt wurden, die hauptsächlich in der Leber metabolisiert werden. Dies unterstreicht auch die Arbeit von Wolf et al. (13) wo Lebergesunden, Patienten mit Fettleber und

Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose verschiedene Kohlenhydrate und Zuckeraustauschstoffe in vergleichbaren Dosierungen intravenös injiziert wurden. Glucose, die ubiquitär utlilisiert wird, erzeugte dabei unabhängig vom Funktionszustand der Leber des Probanden einen mäßigen Abfall des anorganischen Phosphates im Blut, während Fructose, Sorbit und Xylit, die vorwiegend in der Leber metabolisiert werden, bei den Leberzirrhotikern das anorganische Phosphat im Blut am geringsten, bei den Lebergesunden am deutlichsten absenkten. Dies weist darauf hin, daß ein Zusammenhang zwischen der Umsatzgeschwindigkeit der zugeführten Kohlenhydrate in der Leber und ihrem Einfluß auf den Spiegel des anorganischen Phosphates im Blut besteht.

Über Sekundäreffekte und pathophysiologische Veränderungen bei Hypophosphatämie ist noch relativ wenig bekannt. Bei Hypophosphatämie durch parenterale Zufuhr von Kohlenhydraten werden Muskelschwäche, Paraesthesien, zentrale Krämpfe, Koma und auch Todesfälle beschrieben (12). Während aber diese Symptome unter diesen Bedingungen weder einer durch Hyperglykämie induzierten diabetischen Stoffwechsellage noch der Hypophosphatämie zugeordnet werden konnten - nach Normalisierung des Phosphatspiegels im Blut durch parenterale Phosphatzufuhr persistierten die Symptome dennoch - beschrieben Boelens et al. ähnliche Symptome bei einer durch chronische Hämodialyse mit gleichzeitigem Antazida-Abusus hervorgerufenen Hypophosphatämie (14), die durch Zufuhr von anorganischem Phosphat und Hämodialyse gegen ein phosphathaltiges Medium gebessert werden konnte. Bei dem dort beschriebenen Patienten fand sich neben schwerer Muskelschwäche, die sogar die Atmung und die Mimik beeinträchtigte, eine Herabsetzung der Sehnenreflexe bis zu ihrem Verschwinden, Anisochorie, Ballismus, und Artikulationsstörungen bis zur Sprachunverständlichkeit. Als objektive Befunde wurden ein regelmäßiger Delta-Rhythmus im EEG, herabgesetzte Nervenleitungsgeschwindigkeit und ein einer peripheren Denervierung ähnlicher Befund im EMG gefunden.

Auf die oben bereits erwähnte Behandlung besserte sich das klinische Bild erheblich, insbesondere die neurologischen Symptome verschwanden annähernd. Travis et al. (15) fanden ähnliche Symptome bei Hypophosphatämie nach parenteraler Ernährung mit Glucose. Sie konnten dabei eine Verschiebung der Konzentrationen verschiedener Zwischenprodukte der Glykolyse und eine verminderte O_2 -Bindungsfähigkeit des Hämoglobins in den Erythrocyten feststellen. Die Verschiebung der Zwischenproduktkonzentrationen der Glykolyse schrieben die Autoren einer durch ATP- und Phosphat-Mangel hervorgerufenen Änderung von Enzymaktivitäten glycolytischer Enzyme zu. Die von ihnen unter dem Begriff "phosphate depletion syndrome" zusammengefaßten Symptome führten sie teils auf verminderte O_2 -Versorgung der Gewebe, teils auf einen ATP-Mangel in den Geweben aufgrund der Hemmung von Enzymen der Glykolyse zurück. Sie wiesen auch darauf hin, daß es nach Absetzen der parenteralen Kohlenhydratzufuhr bzw. nach zusätzlicher Zufuhr von Kaliumdihydrogenphosphat zu einer Normalisierung des Serumphosphatspiegels und der Zwischenproduktkonzentrationen der Glykolyse kam. Über eine Besserung des klinischen Zustandes nach Ausgleich der Hypophosphatämie wurden jedoch keine Angaben gemacht.

In einigen der bisher zitierten Arbeiten wurde bereits über Phosphatsubstitution bei Hypophosphatämie berichtet. Dabei wurde jeweils mit anorganischen Phosphatverbindungen, vorzugsweise mit Natrium- oder Kalium-hydrogen- bzw. dihydrogenphosphaten, substituiert. Bei der durch parenterale Ernährung hervorgerufenen Hypophosphatämie waren die therapeutischen Erfolge unterschiedlich zu beurteilen; bei dem von Boelens et al. beschriebenen Fall führte die Anwendung von anorganischem Phosphat zur Besserung. Anorganische Phosphatverbindungen wurden auch zur Therapie der Hypercalcämie verwendet (16, 17, 18, 19). Dabei kam es allerdings bei den meisten Patienten zu Calciumphosphatausfällungen in den parenchymatösen Organen, besonders in Niere, Lunge, Magen, Milz und im Gefäßsystem, hier oftmals direkt am Ort der Injektion. Die Calcifizierung

der parenchymatösen Organe war nach kurzfristiger Applikation von Phosphaten noch reversibel, während es nach längerfristigen Gaben anorganischer Phosphate zu irreversiblen Schädigungen der Organe kam. Diese Komplikation wurde aber nur bei hypercalcämischen, nicht bei normocalcämischen Patienten beobachtet.

Parenteral verabreichtes Phosphat wurde immer allein oder vor der Zufuhr anderer Substanzen infundiert. Es ist in der Tat schwierig, anorganische Phosphate über längere Zeit in Infusionslösungen gelöst zu halten, besonders in solchen, die zusätzlich andere Elektrolyte wie z.B. Mg^{2+} oder Ca^{2+} enthalten. Dies wird auch von Herstellern von Infusionslösungen bestätigt. Daher und wegen der oben beschriebenen Komplikationen, die durch die plötzliche Überflutung des Organismus mit anorganischen Phosphaten hervorgerufen werden, erscheint die therapeutische Anwendung anorganischer Phosphate problematisch.

Es drängt sich die Frage auf, ob es nicht günstiger wäre, im Rahmen der parenteralen Ernährung die Phosphatsubstitution mit Substanzen durchzuführen, aus denen anorganisches Phosphat protrahiert freigesetzt werden kann und die in Infusionslösungen stabil sind. Als solche Substanzen bieten sich vor allem organische Phosphorsäureester an, die physiologisch im Stoffwechsel vorkommen wie z.B. phosphorylierte Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels.

Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit war zu untersuchen, ob organische Phosphorsäureester zur Phosphatsubstitution bei der parenteralen Ernährung genutzt werden können. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf DL-Glycerin-3-phosphat, welches im Fall der Anwendbarkeit für einen solchen Zweck in ausreichend großer Menge und preiswert verfügbar wäre. Dabei waren folgende Fragen zu klären:

1. Wird DL-Glycerin-3-phosphat nach parenteraler Zufuhr utlilisiert?
2. Erfolgt die Utilisation nach Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung und reichen Ausmaß und Geschwindigkeit der Spaltung aus, um eine fructoseinduzierte Senkung des anorganischen Phosphats im Blut und in den Geweben auszugleichen?
3. Erfolgt die Spaltung der Phosphorsäureester intrazellulär oder im Blutplasma?
4. Welche Enzyme spalten das Glycerinphosphat, werden D- und L-Form dabei in gleichem Ausmaß gespalten und werden auch andere organische Phosphorsäureester durch diese Enzyme hydrolysiert?
5. Läßt sich durch Glycerinphosphat auch der fructosebedingte Abfall der Adeninnucleotide in der Leber verhindern?

Die Fragen 3 und 4 wurden in Versuchen in vitro mit Blut, Blutplasma und mit gereinigten Enzymen untersucht. Die übrigen Fragen wurden an Versuchstieren bei intravenöser Injektion oder Infusion der zu untersuchenden Substanzen geprüft.

Material und Methoden

I. Materialien

1. Die zur Infusion verwendeten Chemikalien erhielten wir von:
Fa. Merck/Darmstadt: D-Fructose reinst DAB 7
Fluka AG/Buchs S.G. Schweiz: DL-Glycerin-3-phosphat- Na_2
Serva Entwicklungslabor Heidelberg: DL-Glycerin-2-phosphat- Na_2
2. Die übrigen bei den in vitro-Inkubationsversuchen verwendeten organischen Phosphorsäureester bezogen wir von:
Fa. Boehringer/Mannheim: Glucose-6-phosphat, Gluconat-6-phosphat, Fructose-1-phosphat, als Natriumsalze, Fructose-6-phosphat als Bariumsalz.
3. Die für die enzymatischen Nachweisreaktionen erforderlichen Testpackungen und Enzyme wie auch die in den in vitro Versuchen verwendeten gereinigten Enzympräparate wurden von Fa. Boehringer/Mannheim geliefert, alle übrigen für die Nachweisreaktionen erforderlichen Chemikalien kamen von Fa. Merck/Darmstadt.
4. Die in den Injektions- und Infusionsversuchen verwendeten Versuchstiere waren männliche SIV-Ratten aus der Zucht von Ivanovas & Co. 7967 Kisslegg/Allgäu. Die Tiere erhielten bis zum Versuchsbeginn Altromin 1324-Standardnahrung und Wasser in ausreichender Menge.

II. Methoden

1. Vorbereitung und Probengewinnung von biologischem Material bei den Infusions- und Stoßinjektionsversuchen bei Ratten.

a. Vorbereitung

Die in Infusions- und Stoßbelastungsversuchen verwendeten männlichen SIV-Ratten hatten bis unmittelbar vor Beginn des Versuches freien Zugang zu Altromin Standardnahrung und Wasser ad libitum. In Äthernarkose oder Narkose mit 3,6%igem Chloralhydrat in wässriger Lösung 1 ml pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal wurde ein Infusionskatheter, dem eine scharfe Nadel Ø 12 aufgesteckt war, unter Sicht

in die V. cava inferior gelegt. Durch einen durch die paravertebralen Iliopsoasmuskeln gezogenen Haltefaden wurde der Venenkatheter fixiert. Zum Offenhalten des Infusionskatheters erhielten die Ratten bis zum Beginn der Infusionen eine langsame Infusion einer Elektrolytlösung (0,83 % NaCl + 0,03 % KCl, 0,2 ml.h⁻¹)

b. Blut- und Plasmagewinnung für in vitro-Versuche

Es wurde Rattenblut durch Punktion der V. cava inferior mittels einer Blutentnahmekanüle bei aetherbetäubten Ratten gewonnen und in heparinisierten Gefäßen aufgefangen. Zur Plasmagewinnung wurde ein Teil des Blutes für 15 min bei 4000 g zentrifugiert, der Plasmaüberstand dann abpipettiert.

c. Blutprobengewinnung bei Injektions- und Infusionsversuchen

Das aus der abgeschnittenen Schwanzspitze austretende Blut wurde in heparinisierte Blutzuckerpipetten mit 0,1 bzw. 0,2 ml Volumen aufgezogen und anschließend sofort im doppelten Volumen eiskalter 1 M Perchlorsäure enteiweißt.

d. Harnprobengewinnung

Die Harnproben wurden mittels eines in das Praeputium eingebundenen Katheters als 2-Stunden-Spontanharnportionen gewonnen, das Harnvolumen wurde bestimmt und die Harnprobe im gleichen Volumen eiskalter 1 M Perchlorsäure enteiweißt.

e. Leberprobengewinnung

Dazu wurde das Abdomen eröffnet, der linke vordere Leberlappen mit einer anatomischen Pinzette hervorgezogen und sofort mit einer in flüssiger Luft vorgekühlten Aluminiumzange mit breiten Branchen gepackt und zusammengepreßt. Das gefaßte Leberstück wurde mit einem Scherenschlag von der übrigen Leber abgetrennt und sofort in flüssiger Luft durchgefroren. Die hartgefrorene Leber wurde dann mit 1 M Perchlorsäure homogenisiert, wobei eine Verdünnung von 1 g Leber in 5 ml Homogenat gewählt wurde. Das Homogenat wurde anschließend bei 0° C mit 80 000 g x min zentrifugiert. Der

Überstand wurde sofort für Analysen weiterverwendet.

2. Bestimmungsmethoden

a. Bestimmung des anorganischen Phosphates in Blut, Harn Leber und in vitro-Ansätzen

Die Bestimmung erfolgte nach einer verlierten Bestimmung von Phosphor und Phosphatiden von Boehringer/Mannheim aus den Perchlorsäureüberständen der Proben. Es wurde in der Regel 0,1 ml des Perchlorsäureüberstandes der Probe in den Meßansatz eingebracht. Ergaben sich bei der photometrischen Bestimmung Extinktionen über 0,4, so wurden diese Ansätze nach vorherigem Verdünnen wiederholt, bei zu geringen Extinktionen wurden größere Volumina in die Ansätze eingebracht.

Weiterhin enthielten die Ansätze 0,25 ml 1 M Perchlorsäure, 1,0 ml Aqua bidest. und 1,0 ml einer Reagenzmischung aus Ammoniummolybdat, Ammoniumvanadat in Schwefel- und Salpetersäure. Nach Zugabe des Reagenzgemisches wurden die Meßansätze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann im Eppendorf-Photometer bei 405 nm gegen Leerwert und Standard (Standardkonzentration = 5 mg Phosphor/100 ml) gemessen.

b. Bestimmung des Gesamtphosphates in Blut, Harn, Leber und in vitro Ansätzen

Diese Bestimmung erfolgte vom Meßansatz her genau wie die Bestimmung des anorganischen Phosphates. Die Proben mußten allerdings in der Regel für das Blut im Verhältnis 1:2, für den Harn und die Leber im Verhältnis 1:4, 1:5 oder 1:10 verdünnt werden. Außerdem wurden die Meßansätze vor Zugabe des Wassers und der Reagenzmischung 30 min im Sandbad bei 200° C mit 0,25 ml 1 M PCA versetzt. Nach dem Abkühlen der Proben wurde dann wie unter a. verfahren.

c. Bestimmung von L-Glycerin-3-phosphat und Glycerin in Blut, Harn und Leber

Die Bestimmung erfolgte aus mit gleicher Volumina 0,6 M

(für Blutproben) und 1,0 M (für Harnproben) KOH neutralisierten Perchlorsäureüberständen. Die Proben hatten dabei einen pH von ca 7,5. Die Leberproben wurden am pH-Meter mit 2 M KOH auf pH 7,0 eingestellt.

Gemessen wurde im Eppendorf-Photometer mit Schreiber (Bereich 0,25; 1 cm/min Vorschub) bei 366 nm im Sinne einer Endwertbestimmung. Der Meßansatz für beide Bestimmungen enthielt 1,5 ml 0,2 M Glycin- 1 M Hydrazin-Puffer pH 9,3-9,5 mit 0,05 ml 0,06 M ATP-Lösung pH 6-8 und 0,02 ml wässriger NAD-Lösung (40 mg/ml) pH 6-8.

Je nach Gehalt der Probe an L-Glycerin-3-phosphat und Glycerin wurde zwischen 0,02 und 0,5 ml Probenüberstand eingesetzt. Die Messung des L-Glycerin-3-phosphates wurde mit 0,02 ml Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (10 mg/ml) die Messung des Glycerins mit 0,01 ml Glycerinkinase (2 mg/ml) gestartet, und der Endwert abgewartet. Die Berechnung des Probengehaltes an den bestimmten Substanzen erfolgte nach Abzug eines Leerwertes.

d. Bestimmung von Lactat in der Leber (nach modifiziertem Boehringer-Test)

Die Bestimmung erfolgte aus dem wie oben angegeben neutralisierten Leberprobenüberstand im Eppendorf-Photometer mit Schreiber (s.o.) als Endwertbestimmung bei 366 nm. Der Meßansatz enthielt 1,5 ml 0,2 M Glycin- 1 M Hydrazin-Puffer pH 9,3-9,5 mit 0,02 ml wässriger NAD-Lösung (40 mg/ml) pH 6-8 und 0,2 ml Probenüberstand. Gestartet wurde die Reaktion mit 0,02 ml Lactatdehydrogenase (5 mg/ml). Auch hier war bei der Bestimmung des Lactatgehaltes der Probe der Abzug eines Leerwertes erforderlich.

e. Bestimmung von ATP in der Leber (nach variiertem Boehringer-Test)

Die Bestimmung erfolgte aus neutralisiertem (s.o.) Perchlorsäureüberstand der Leberprobe im Eppendorf-Photometer mit Schreiber bei 366 nm als Endwertbestimmung.

Im Meßansatz waren enthalten:

2,0 ml 0,5 M Triäthanolaminpuffer pH 7,6 + 0,004 M

Magnesiumsulfat + 0,006 M Glycerat-3-phosphat
0,2 ml 2,5 mM wässrige NADH-Lösung und
0,2 ml neutraler Probenüberstand. Die Reaktion wurde mit
0,02 ml einer Enzymmischung aus 7 mg Glycerinaldehyd-3-
phosphatdehydrogenase, 1 mg Phosphatglycerat-Kinase und
2 mg Glycerindehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase pro
ml Suspension gestartet. Der Endwert war nach ca 15 min
erreicht. Bei der Bestimmung wurde darauf geachtet, daß
die Messung des ATP-Gehaltes spätestens 1 Stunde nach
der Probenentnahme begonnen wurde, da es sowohl im neutralen
wie im sauren Milieu auch in der Kälte zu einem Zerfall des
ATP kommt.

f. Bestimmung von Pyruvat, ADP und AMP in der Leber
(nach einem modifizierten Boehringer-Test)

Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte aus einem Meßen-
satz. Gemessen wurde im Eppendorf-Photometer mit Schreiber
bei 366 nm. Der Meßansatz enthielt:
1,5 ml 0,1 M Triäthanolamin-HCl-Puffer pH 7,5
0,2 ml einer Lösung mit 0,01 M Phosphoenolpyruvat + 1,3 M
KCl + 0,4 M Magnesiumsulfat
0,2 ml 2,5 mM wässrige NADH-Lösung und
0,5 ml neutralen Probenüberstand. Die Bestimmung von Pyruvat
wurde mit 0,02 ml Lactat-Dehydrogenase 1 mg/ml gestartet.
Nach Erreichen des Endwertes wurde die ADP-Messung mit 0,02 ml
Pyruvatkinase 1 mg/ml gestartet und der Endwert abgewartet.
Dann wurde für die AMP-Bestimmung 0,02 ml Myokinase 5 mg/ml
zugegeben. Aus den sich ergebenden Extinktionsdifferenzen
wurden Pyruvat, ADP und AMP nach Abzug eines Leerwertes
berechnet. Hier wurde darauf geachtet, daß spätestens 2
Stunden nach der Probenentnahme mit der Messung begonnen wurde.

g. Bestimmung von Glucose und Fructose im gekoppelten optischen
Test im Blut

Die Bestimmung erfolgte aus neutralisiertem Perchlorsäure-
Überstand der Blutproben im Eppendorf-Photometer bei 366 nm.
Der Meßansatz enthielt 2,5 ml 0,3 M Triäthanolamin-HCl-Puffer

pH 7,5 mit 0,003 M Magnesiumsulfat, 0,1 ml 0,016 M wässriger ATP-Lösung pH 7,5, 0,1 ml 0,012 M wässriger NADP-Lösung 0,05 ml neutralem Probenüberstand und 0,01 ml Hexokinase 1 mg/ml. Glucosebestimmung wurde mit 0,01 ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase 2 mg/ml gestartet und der Endwert abgewartet. Dann wurde für die Fructosebestimmung mit 0,01 ml Phosphoglucose-Isomerase 2 mg/ml erneut gestartet. Aus den Endwerten wurden die Glucose- und Fructosekonzentrationen im Blut berechnet (20).

h. Blutglucosebestimmung nach der GOD-Methode

Die Messung erfolgte aus dem Perchlorsäureüberstand der Blutprobe. In den Meßansatz wurden 0,1 ml Perchlorsäuren Probenüberstandes mit 2,5 ml eines Reagenzgemisches aus 100 Teilen 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 mit 0,04 mg POD/0,25 mg GOD/ml und 1 Teil 6,6 mg o-Dianisidinhydrochlorid/ml gegeben. Nach 35 min bei Raumtemperatur wurde gegen Leerwert und Standard (9,1 mg Glucose/100 ml) im Eppendorf-Photometer bei 436 nm gemessen.

Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in üblicher Weise unter Anwendung des Rechners Hewlett-Packard HP-45 berechnet. Wo der Vergleich zweier Mittelwerte unabhängiger Stichproben im t-Test möglich war, wurden Unterschiede auf dem 1%-Niveau als statistisch signifikant angesehen. Unterschiede auf dem 2,5 %-Niveau wurden als statistisch auffällig bezeichnet. Die nach Infusionen verschiedener Zusammensetzung und Dosierung gemessenen Parameter in der Leber (ATP, ADP, AMP, Summe der Adenosinnucleotide, anorganisches Phosphat, Gesamtphosphat, Lactat und Pyruvat) sind aus metabolischen Gründen mit aller Wahrscheinlichkeit nicht voneinander unabhängig. Aus diesem Grund würde auch ein Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander hinsichtlich dieser einzelnen Parameter in der Varianzanalyse in seiner Gesamtaussage nicht befriedigen und die Wahrscheinlichkeitsaussage der Tests wäre nicht exakt.

Deshalb wurde bei den Tabellen 5, 6 und 9 auf statistische Tests verzichtet. In einigen Fällen wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 unter Zuhilfenahme des Rechners Hewlett-Packard HP-65 bestimmt.

Die Bestimmung der Eliminationskonstanten und der Halbwertszeit für Glycerin-3-phosphat erfolgte nach F. DOST (23).

ERGEBNISSE

In einem Vorversuch wurde einer Ratte von 252 g Körpergewicht 0,5 mMol DL-Glycerin-3-phosphat-Na in 1 ml gelöst durch einen Cavakatheter injiziert. Tab. 1 zeigt, daß nach 5 min ein deutlicher Anstieg des L-Glycerin-3-phosphates - nur dieses kann enzymatisch bestimmt werden - wie auch des Glycerins im Blut auftritt. In der Folge fallen beide Parameter kontinuierlich auf die Werte vor Beginn des Versuches ab. Daraus ergibt sich, wie Abb. 1 zeigt, daß L-Glycerin-3-phosphat rasch und nach einer Kinetik 1. Ordnung aus dem Blut eliminiert wird. Die Eliminationskonstante beträgt $0,063 \text{ min}^{-1}$, die Halbwertszeit 11,0 min. Ein erheblicher Anteil, nämlich 40 % der zugeführten L-Form werden unverändert im Harn ausgeschieden, so daß die metabolische Elimination wesentlich geringer ist als die Gesamtelimination. Trotzdem bleibt ein beträchtlicher Anteil, der im Organismus metabolisiert wird. Um zu prüfen, ob dieser Anteil ungespalten in die Zellen eindringt, was nach den bekannten Eigenschaften phosphorylierter Intermediärprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels unwahrscheinlich ist, oder ob er intravasal hydrolysiert wird, wurde zunächst das Verhalten des Spiegels an anorganischem Phosphat im Blut nach Stoßbelastungen untersucht.

I. Intravenöse Stoßbelastungen mit Glycerin-3-phosphat und Fructose.

Die in diesen Versuchen verwendeten Ratten hatten ein Körpergewicht zwischen 220 und 280 g. Sie erhielten über einen Cava-Katheter eine Injektion von DL-Glycerin-3-phosphat oder Fructose oder einem Gemisch aus beiden. Die Substanzen wurden innerhalb 1 min in 1,5 ml verabreicht. Anschließend wurde mit 0,25 ml physiologischer Elektrolytlösung nachgespült.

I. 1. Anorganisches Phosphat im Blut nach Stoßbelastungen

Als Kriterium für die Freisetzung von anorganischem Phosphat aus Glycerinphosphat wurde die Erhöhung des anorganischen Phosphat-spiegels im Blut angesehen. Ferner wurde geprüft, ob ein durch Fructose ausgelöster Abfall des Phosphates im Blut durch Zufuhr

Tab. 1

L-Glycerin-3-phosphat und Glycerin im Blut einer Ratte nach Stoßbelastung mit DL-Glycerin-3-phosphat.

Dargestellt sind die Absolutwerte in $\mu\text{Mol/ml}$ im zeitlichen Verlauf in min.

Rattengewicht: 252 g; Dosis: 0,5 mMol DL-Glycerin-3-phosphat in 1 ml Aqua bidest.

Zeit (min)	L-G-3-P ($\mu\text{Mol/ml Blut}$)	Glycerin ($\mu\text{Mol/ml Blut}$)
0	0,079	0,410
5	1,168	0,964
(10	0,637	0,774)
20	0,495	0,759
30	0,297	0,636
40	0,198	0,533
50	0,099	0,492
60	0,079	0,574
90	0,059	0,390
120	0,079	0,410

von Glycerinphosphat ausgeglichen werden kann. In später beschriebenen in vitro-Versuchen wird auch der Anstieg an freiem Glycerin gemessen.

In Abb. 2 a-c sind drei solcher Stoßbelastungsversuche exemplarisch dargestellt. Die in diesen Versuchen verwendeten Dosierungen für die zugeführten Substanzen betrugen:

DL-Glycerin-3-phosphat: 0,5 mMol pro Ratte in den ersten Untersuchungen (Abb. 2 a und b) und 0,15 mMol pro Ratte in den folgenden Versuchen (Abb. 2 c).

Fructose: 1 mMol pro Ratte in den ersten Versuchen (Abb. 2 a) und 2 mMol pro Ratte in den weiteren Versuchen (Abb. 2 b und c).

Gemisch aus DL-Glycerin-3-phosphat und Fructose: Die Dosierungen im Gemisch entsprechen den jeweiligen Einzeldosen für die Substanzen bei alleiniger Infusion in diesem Versuch.

Nach Glycerin-3-phosphat in einer Dosis von 0,5 mMol stieg der Spiegel an anorganischem Phosphat im Blut deutlich an, erreichte nach ca 30 min seinen höchsten Wert und fiel dann kontinuierlich auf Werte um den Ausgangswert ab. Bei der geringeren Dosierung von 0,15 mMol stieg der Blutspiegel des anorganischen Phosphates allmählich an und blieb gegen Ende des Versuchszeitraumes auf dem erhöhten Niveau.

Fructose in der Dosierung von 1 mMol pro Tier rief einen nur geringen Abfall des anorganischen Phosphates im Blut hervor, während es bei der höheren Dosis von 2 mMol pro Ratte zu einem deutlichen initialen Abfall des anorganischen Phosphates im Blut kam, der sich jedoch nach ca 30 min spontan ausglich.

In einigen Versuchen kam es sogar zu einem Anstieg des anorganischen Phosphates gegenüber dem Ausgangswert vor der Injektion. Daß der Abfall des anorganischen Phosphates im Blut tatsächlich durch Fructose und nicht etwa allein durch die Volumenbelastung ausgelöst wurde, zeigte sich unter Stoßbelastung mit dem gleichen Volumen physiologischer Elektrolytlösung, wobei der Spiegel des anorganischen Phosphates im Blut konstant blieb (Abb. 2 c). Der spontane Ausgleich des anorganischen Phosphates im Blut 30 min nach Fructoseinjektion zeigt, daß es sich offensichtlich um eine vorübergehende Störung der Homöostase handelt, wie

Tab. 2

Adenosinnucleotide und anorganisches Phosphat in der Rattenleber nach Injektion von Fructose mit und ohne DL-Glycerin-3-phosphat oder von Elektrolytlösung.

Vergleich eigener Werte mit Befunden anderer Untersucher. Angaben in $\mu\text{Mol/g}$ Leberfrischgewicht.

Untersucher	Substanz (Dosis)	Zeit der Probenentnahme (min)	ATP	ADP	AMP	Gesamt-adenosinnucleotide	anorgan. Phosphat	Zahl der Unters.
eigene Werte	Tyrode (1 ml)	5	2,52	1,85	0,71	5,08	6,87	2
		15	2,61	1,96	0,55	5,12	7,39	1
	Fructose (1 mMol)	5	1,02	1,17	0,58	2,71	3,29	2
		15	1,80	1,22	0,31	3,33	7,96	1
	Fructose (1 mMol) +DL-Glycerin-3-phosphat (0,5 mMol)	5	0,83	1,18	0,80	2,81	3,10	2
		15	1,17	1,44	0,56	3,17	10,84	1
Raijio et al (2)	-	0	2,90 $\pm$ 0,09	0,42 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,03	3,57 $\pm$ 0,08	3,86 $\pm$ 0,16	
	Fructose (1 mMol)	5	1,16 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,04	1,90 $\pm$ 0,07	1,29 $\pm$ 0,07	5
		10	1,41 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,02	1,96 $\pm$ 0,07	1,79 $\pm$ 0,26	6
		20	1,75 $\pm$ 0,17	0,31 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,01	2,24 $\pm$ 0,19	4,69 $\pm$ 0,44	6
Brinkroff Bessler (3)	Tyrode	5	3,12 (0,51)	1,17 (0,11)	0,36 (0,15)	4,62 (0,32)	4,1 (0,44)	11
	Fructose (1 mMol)	5	1,04 (0,24)	1,10 (0,12)	0,62 (0,20)	2,77 (0,27)	2,1 (0,37)	11
Bode, Zelder et al (4 a)	Fructose (0,8 g/kg)	10	1,13 $\pm$ 0,24	0,82 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,11	2,21 $\pm$ 0,31	-	

Brinkrolf und Bäßler (3) es auch für Phosphat und Adenosin-nucleotide in der Leber vermutet hatten.

Um zu prüfen, ob der durch Fructose induzierte initiale Abfall des anorganischen Phosphates im Blut durch Zufuhr von Glycerin-3-phosphat ausgeglichen werden kann, wurde die Applikation von Fructose mit der Gabe von DL-Glycerin-3-phosphat kombiniert. In dem in Abb. 2 a dargestellten Versuch war das Verhältnis zwischen Fructose und Glycerin-3-phosphat insofern ungünstig, als es durch Fructose in dieser Dosierung nicht zu einem deutlichen Abfall des anorganischen Phosphates im Blut kam. Das der Fructose zugesetzte Glycerin-3-phosphat führte zu einer Erhöhung des anorganischen Phosphat-spiegels, wobei die Werte sich im zeitlichen Verlauf analog den Werten nach Fructoseinjektion, jedoch auf einem entsprechend höheren Niveau hielten. Bei gleicher DL-Glycerin-3-phosphat-dosis und verdoppelter Fructosedosis wurde der initiale, fructosebedingte Abfall des anorganischen Phosphates im Blut vollständig ausgeglichen, jedoch kam es analog zum spontanen Ausgleich des anorganischen Phosphates unter alleiniger Fructosegabe im Verlauf des Versuches zu einer Überhöhung des anorganischen Phosphates im Blut gegen Ende des Versuchszeitraumes. Auch die niedrigere Dosierung des DL-Glycerin-3-phosphates von 0,15 mMol pro Ratte reichte bei Zufuhr von 2 mMol Fructose aus um den initialen Abfall des anorganischen Phosphates im Blut auszugleichen. Der terminale Phosphatanstieg war aber auch bei diesem Dosierungsverhältnis nicht zu vermeiden (vergl. Abb. 2 c). Der deutliche Phosphatanstieg im Blut nach Injektion von Glycerinphosphat spricht für eine intravasale Spaltung des Phosphorsäureesters.

I. 2. Phosphatfraktionen der Leber nach Stoßbelastungen

Die fructosebedingte Verminderung des anorganischen Phosphates im Blut kann ähnlich interpretiert werden wie der von Heucken-kamp et al. (9) nach Glucosegabe bei Normalpersonen und Diabetikern auftretende Abfall des anorganischen Phosphates im

Serum, nämlich durch gesteigerte Phosphorylierung der Fructose in der Zelle und dem damit verbundenen Phosphatmehrbedarf. Dies würde auch die von verschiedenen Autoren beschriebene Senkung des Adenosinnucleotidgehaltes, insbesondere des ATP-Anteiles, und des Phosphatgehaltes der Leber erklären. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anderer Autoren zu prüfen, erhielten Ratten intravenöse Stoßbelastungen mit 1 mMol Fructose mit und ohne Zusatz von 0,5 mMol DL-Glycerin-3-phosphat. 5 und 15 min nach Injektion wurden Leberproben auf ihren Gehalt an ATP, ADP, AMP und anorganischem Phosphat analysiert. Zu den gleichen Zeiten wurden Leberproben von mit Elektrolytlösung behandelten Ratten zum Vergleich untersucht. Die Ergebnisse sind im Zusammenhang mit Befunden vergleichbarer Untersuchungen anderer Autoren in Tab. 2 dargestellt. Wie dort zu sehen ist, war es sowohl nach Fructose- wie nach Fructose mit DL-Glycerin-3-phosphat nach 5 min zu einem deutlichen Absinken der Adenosinnucleotide und des anorganischen Phosphates gegenüber den Vergleichswerten gekommen. 15 min nach Injektion waren die Adenosinnucleotide und das anorganische Phosphat bereits wieder angestiegen. Dabei lagen die Werte für die Adenosinnucleotide noch deutlich unter den Vergleichswerten, während das anorganische Phosphat sich nach Fructosebelastung völlig ausgeglichen, nach Injektion des Gemisches sogar überkompensiert hatte.

Da die Befunde grundsätzlich mit denen anderer Autoren übereinstimmen und Stoßbelastungen sehr unphysiologische Verhältnisse darstellen, wurde keine größere Anzahl von Versuchen durchgeführt.

II. In vitro-Versuche zur Spaltung von Phosphorsäureestern

Von der Tatsache ausgehend, daß organische Phosphorsäureester in der Regel die Zellmembranen nicht zu durchdringen vermögen (24,25) wurden verschiedene Substrate

1. mit Rattenvollblut und Rattenblutplasma inkubiert um festzustellen, ob der beobachtete Anstieg des anorganischen Phosphates bei den in-vivo-Versuchen tatsächlich durch eine intravasale Spaltung erklärbar ist.

Tab. 3

Spaltung von DL-Glycerin-3-phosphat bei in vitro-Inkubation mit Rattenblut.

Dargestellt ist die Freisetzung von Glycerin und von anorganischem Phosphat in $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$ zu verschiedenen Zeiten (h)

Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 2 ml enthielt 150 μMol DL-Glycerin-3-phosphat, 50 μMol Tris; 1 ml des Volumens war Rattenblut mit 75 E Heparin. Der Ansatz war auf pH 7,4 eingestellt und wurde bei 37°C im Wasserbad geschüttelt.

Zeit (Std.)	Glycerin $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$		Phosphat $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$	
	1. Versuch	2. Versuch	1. Versuch	2. Versuch
0	2,8	3,1	0,14	1,46
1	3,9	7,9	1,66	3,14
2	7,7	7,2	2,14	3,47
4	10,7	9,8	4,22	7,57
6	13,9	13,4	5,65	10,7

2. mit definierten Enzympräparaten (alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm und saurer Phosphatase aus Kartoffeln) inkubiert, um zu prüfen ob eine Abspaltung von anorganischem Phosphat aus Phosphorsäureestern durch diese Enzyme katalysiert wird.

Die Inkubationen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 37° C durchgeführt, wobei für jede Zeitspanne und jedes Substrat ein gesonderter Ansatz hergestellt wurde. Die Ansätze für Rattenvollblut und Blutplasma enthielten in einem Volumen von 0,3 ml 1 μ Mol Substrat und 0,25 ml Blut oder Plasma, die Ansätze für die definierten Enzympräparate enthielten in 0,36 ml 1 μ Mol Substrat, 85 mM Tris-Puffer pH 7,4 0,85 mM $MgCl_2$ und 0,01 ml Enzymsuspension. Es wurde nach verschiedenen Zeiten durch Zusatz von 1 M Perchlorsäure enteiweißt, wobei bei den Ansätzen mit Rattenvollblut 0,5 ml, sonst nur 0,25 ml benötigt wurden.

Im Perchlorsäureüberstand wurden anorganisches Phosphat und Gesamtphosphat bestimmt.

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche sind für die einzelnen Substrate in den Abb. 3 a-c für DL-Glycerin-3-phosphat, DL-Glycerin-2-phosphat und Gluconat-6-phosphat dargestellt. Auf die Darstellung der Befunde für Fructose-1-phosphat, Fructose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat kann in diesem Zusammenhang verzichtet werden, da sie sich gegenüber den definierten Enzympräparaten und dem Vollblut bzw. dem Blutplasma ebenso verhalten wie die Glycerinphosphate.

Die Abbildungen zeigen, daß alle verwendeten Phosphorsäureester durch Blut und durch Plasma rasch gespalten werden und daß die Spaltungsgeschwindigkeit für alle Substrate annähernd gleich ist. Lediglich für Gluconat-6-phosphat liegt die Spaltungsrate höher (Abb. 3 c). Daß das freigewordene anorganische Phosphat tatsächlich aus den im Blut gespaltenen Phosphorsäureestern stammt, konnte am Beispiel des Glycerin-3-phosphat belegt werden. Aus der in Tab. 3 dargestellten Bilanz bei der Spaltung von

DL-Glycerin-3-phosphat in Rattenblut geht hervor, daß neben dem anorganischen Phosphat äquivalente Mengen Glycerin freigesetzt werden.

Wie die Abb. 3 a-c zeigen, liegt die Spaltungsrate im Plasma höher als im Blut. Korrigiert man die Vollblutwerte unter Zugrundelegen eines Hämatokrits von ca 50 % (26) so ergibt sich Übereinstimmung mit der Abspaltungsrate im Plasma. Man kann daraus schließen, daß die Hydrolyse der Phosphorsäureester im Plasma erfolgt und diese nicht in die Erythrozyten eindringen.

In den Abb. 3 a-c sind neben den Befunden für Blut und Plasma auch die Ergebnisse der Untersuchungen der Phosphorsäureesterspaltung mit definierten Enzympräparaten dargestellt. Die alkalische und die saure Phosphatase spalten Phosphorsäureester rasch. Jedoch sind die Befunde für die alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) und die saure Phosphatase (aus Kartoffeln) weder untereinander noch mit den Befunden, die für die Phosphorsäureesterspaltung durch Blut oder Plasma erhoben wurden, quantitativ vergleichbar, da mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten gearbeitet wurde.

In den folgenden Abb. 4 a-f sind daher Spaltungen der verschiedenen Phosphorsäureester im Plasma und mit alkalischer und saurer Phosphatase dargestellt, wobei die Aktivitäten der gereinigten Enzyme so gewählt wurden, daß sie mit den im Plasma gemessenen entsprechenden Enzymaktivitäten übereinstimmten. Generell zeigt sich, daß die alkalische Phosphatase für den Hauptanteil der Spaltung der organischen Phosphorsäureester verantwortlich ist und daß die saure Phosphatase in der im Plasma vorkommenden Aktivität nur einen sehr geringen Einfluß auf die Spaltung dieser Verbindungen hat.

Daß die Geschwindigkeit der Spaltung der verschiedenen Phosphorsäureester durch alkalische Phosphatase bei gleichen Aktivitäten fast gleich ist, zeigt Abb. 5. Hier ist die prozentuale Spaltung der verschiedenen Substrate im zeitlichen Verlauf dargestellt. Den Werten liegen für jedes Substrat mehrere in vitro-Inkubationen zugrunde.

III. Intravenöse Dauerinfusionen mit DL-Glycerin-3-phosphat und Fructose

Nachdem Stoßbelastungen gezeigt hatten, daß Glycerin-3-phosphat einen fructosebedingten Abfall des anorganischen Phosphates im Blut ausgleichen kann und die in vitro-Inkubationen darauf hinwiesen, daß Glycerinphosphat im Blut gespalten wird, wurde nun das Verhalten des anorganischen Phosphates im Blut unter konstanter intravenöser Dauerinfusion von Glycerinphosphat und Fructose untersucht.

III. 1. 2-Stundeninfusionen mit hohen Fructosedosen

Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt.

In Versuchsserie A wurde das Verhalten des anorganischen Phosphates im Blut unter den gegebenen Versuchsbedingungen untersucht, in Versuchsserie B das Verhalten der Adenosin-nucleotide, der Phosphate und der Metabolite Lactat und Pyruvat in der Leber geprüft.

Versuchsreihe A

Es wurden Ratten mit einem mittleren Gewicht von $236 \text{ g} \pm 23 \text{ g}$ ($n=30$) verwendet. Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt, die folgende Dosen infundiert erhielten:

a. Gruppe der mit Fructose infundierten Tiere (10)

Sie erhielten in einem Volumen von $1,2 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ $2,5 \text{ g}$ Fructose ($= 13,9 \text{ mMol}$). $\text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nach vorheriger Infusion von $1,2 \text{ ml}$ physiologischer Elektrolytlösung. h^{-1} über 45 min .

b. Gruppe der mit Gemisch aus Fructose und DL-Glycerin-3-phosphat infundierten Tiere (9)

Sie erhielten in einem Volumen von $1,2 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ $2,5 \text{ g}$ Fructose und $0,07 \text{ g}$ DL-Glycerin-3-phosphat ($= 0,216 \text{ mMol}$). $\text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ über 2 Std nach vorheriger Infusion von $0,07 \text{ g}$ DL-Glycerin-3-phosphat $\text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ über 45 min .

c. Gruppe der mit DL-Glycerin-3-phosphat infundierten Ratten (11)

Sie erhielten $0,07 \text{ g}$ DL-Glycerin-3-phosphat. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in einem Volumen von $1,2 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ über 2 Std 45 min .

Ergebnisse:

In Vorversuchen war zunächst eine ausreichende Fructosedosis zu finden, die einen konstant reproduzierbaren Abfall des anorganischen Phosphates im Blut hervorruft. Ebenso war die gerade eben ausreichende Menge Glycerinphosphat zum Ausgleich des anorganischen Phosphates im Blut zu finden.

Die anfangs gewählte Dosis von $1,5 \text{ g Fructose} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ rief keinen konstant reproduzierbaren Abfall des anorganischen Phosphates im Blut hervor. Zwei Versuche dazu sind in Abb. 6 a und b dargestellt. Mit der höheren Fructosedosis von $2,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (vgl. Abb. 6 c, Abb. 7, Abb. 8 a) ließ sich ein deutlicher und in jedem Falle zu wiederholender Phosphatabfall hervorrufen. Das anfangs mit $0,7 \text{ g} (= 2160 \text{ } \mu\text{Mol}) \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ zu hoch angesetzte DL-Glycerin-3-phosphat verursachte bei alleiniger Infusion wie im Gemisch (Abb. 6 a) einen excessiven Anstieg des anorganischen Phosphates.

Die Dosis konnte über $1/5$ (Abb. 6 b) auf $1/10$ gesenkt werden (Abb. 6 c). Wie Abb. 6 c zeigt, setzte die phosphatsteigernde Wirkung des Glycerinphosphates erst ca 45 min nach Infusionsbeginn ein. Der initiale Abfall des anorganischen Phosphates im Blut unter Fructoseinfusion wurde deshalb nicht verhindert. Daher wurde in den folgenden Infusionsversuchen mit DL-Glycerin-3-phosphat 45 min vorinfundiert.

Das Ergebnis eines solchen Versuches mit Vorinfusion von DL-Glycerin-3-phosphat ist in Abb. 7 dargestellt, die Ergebnisse der darauf folgenden Versuchsreihe in Abb. 8 a-c und Tab. 4 zusammengefaßt.

Aus den Daten in Tab. 4 ist zu entnehmen, daß unter Fructoseinfusionen in der Dosierung von $2,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ das anorganische Phosphat im Blut absinkt. Diese Verminderung des anorganischen Phosphates ist bis 60 min deutlich, danach kommt es zu einem Ansteigen des anorganischen Phosphates in den Normbereich. 30 min nach Ende der Fructoseinfusion steigt das anorganische Phosphat auf überhöhte Werte an. Ähnliche Befunde konnten auch beim Menschen erhoben werden (27).

Anorganisches Phosphat, Glucose und Fructose im Blut bei Dauerinfusionen von 2 Stunden

Gruppe b: 45 min Vorinfusion von DL-Glycerin-3-phosphat: $0,07 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0-0_2$).
Dann 2 Std. Infusion von Fructose ($2,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) + DL-Glycerin-3-phosphat ($0,07 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

[illegible]

Der initiale Abfall des anorganischen Phosphates wird durch Glycerin-3-phosphat kompensiert (vgl. Gruppe b); Es kommt dabei zu einem allmählichen Anstieg über den Ausgangswert hinaus, der 30 min nach Ende der Infusion weit über die Norm ansteigt. Unter Glycerin-3-phosphatinfusion allein kommt es nur zu einem mäßigen Anstieg des anorganischen Phosphates im Blut gegen Ende der Infusion.

Für die Phosphatspiegel in Gruppe a (Fructose) und in Gruppe b (Fructose + Glycerin-3-phosphat) wurde die Summe aller Differenzen (5 - 120 min) gegen den Ausgangswert ($\bar{Q}_0$) bestimmt. Diese Summenwerte beider Gruppen wurden im t-Test für nicht verbundene Stichproben miteinander verglichen. Die Phosphatwerte unter Zusatz von Glycerin-3-phosphat sind signifikant höher als unter Fructoseinfusion allein (Irrtumswahrscheinlichkeit 1 %).

Die Konzentration der Glucose im Blut

Die Blutglucosekonzentration stieg unter Fructose mit und ohne Glycerin-3-phosphat leicht an. Glycerin-3-phosphat allein hatte keinen Einfluß auf die Blutglucosekonzentration.

Die Konzentration der Fructose im Blut

Die Konzentration der Fructose im Blut stieg unter Infusion von Fructose allein oder im Gemisch mit Glycerin-3-phosphat deutlich an. Ein Fließgleichgewicht stellte sich nicht ein. Bei Infusion von DL-Glycerin-3-phosphat war Fructose im Blut nicht nachweisbar.

Versuchsreihe B

Die Körpergewichte der verwendeten Ratten lagen im Mittel bei den verschiedenen Gruppen zwischen $259 \text{ g} \pm 19 \text{ g}$ ($n=10$) und $253 \text{ g} \pm 7 \text{ g}$ ($n=12$). Wie in Versuchsreihe A erhielten die Ratten 45-minütige Vorinfusionen.

- a. Vergleichsgruppe: Infusion von $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$ physiologische Elektrolytlösung
- b. Infusion von $1,5 \text{ g Fructose.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ in $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$ nach 45-minütiger Vorinfusion von $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$ Elektrolytlösung
- c. Infusion von $2,5 \text{ g Fructose.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ in $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$ nach 45-minütiger Vorinfusion von $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$ Elektrolytlösung
- d. Infusion von $2,5 \text{ g Fructose} + 0,07 \text{ g DL-Glycerin-3-phosphat.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ in $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$ nach 45-minütiger Vorinfusion von $0,07 \text{ g DL-Glycerin-3-phosphat}$ in $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$.

Die Leberproben wurden unmittelbar nach Ende der Infusionen entnommen.

Bei den Infusionen kam es abhängig von der zugeführten Fructosemenge zu einem beträchtlichen Anstieg der Lebergewichte. Die Zunahme der Lebergewichte nach Infusion des Gemisches (s. Gruppe d) war nicht so deutlich wie nach alleiniger Fructoseinfusion. Aufgrund der Bestimmung des Bestimmtheitsmaßes r^2 zeigte sich aber, daß die Lebergewichte der Ratten mit den Körpergewichten in einem engen Zusammenhang standen. Lediglich bei den Ratten der Gruppe d konnte dies nicht gezeigt werden.

Bestimmtheitsmaß für den Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Lebergewicht der Versuchstiere bei:

a) Elektrolytinfusion	$r^2 = 0,81$
b) 1,5 g Fructose.kg ⁻¹ .h ⁻¹	$r^2 = 0,75$
c) 2,5 g Fructose.kg ⁻¹ .h ⁻¹	$r^2 = 0,78$
d) 2,5 g Fructose + 0,07 g DL-Glycerin-3-phosphat.kg ⁻¹ .h ⁻¹	$r^2 = 0,02$

Auch im t-Test für Mittelwerte nicht verbundener Stichproben ließ sich eine signifikante Änderung der Lebergewichte unter Fructosegabe nicht zeigen.

In den Tabellen 5 und 6 sind Konzentrationen und Gesamtmengen verschiedener Metabolite in der Leber bei den einzelnen Versuchsgruppen zusammengestellt.

Der Vergleich der Konzentrationen in Tab. 5 und der Gesamtmengen der Metabolite in Tab. 6 zeigt, daß bei geringeren Fructose-dosierungen (1,5 g.kg⁻¹.h⁻¹ über 2 h) lediglich die Konzentration der Adenosinnucleotide abnimmt, die Gesamtmenge - ausgenommen ATP - in der Leber jedoch gleich bleibt. Bei der hohen Fructose-dosis kommt es zum Absinken sowohl der Konzentration wie der Gesamtmenge der Adenosinnucleotide. Dies ist nach Angaben aus der Literatur auch zu erwarten.

Die Gesamtposphatmenge in der Leber steigt unter Fructose mit und ohne Glycerin-3-phosphat an, die Konzentration an Gesamtposphat wird dagegen nur unter Infusion des Gemisches (Gruppe d) erhöht. Die Konzentration des anorganischen Phosphates bleibt unter Gabe von Fructose wie Gemisch annähernd unverändert, die Gesamtmenge steigt dagegen an.

Lactat und Pyruvat steigen mit steigenden Fructosegaben an, Zusatz von Glycerin-3-phosphat hat sowohl hinsichtlich der Konzentration wie der Gesamtmengen keinen meßbaren Einfluß auf diese Parameter.

Tabella 5:

Metabolitkonzentrationen in der Leber nach 2 Stunden Dauerinfusion

m = Mittelwert; s = Standardabweichung

Gruppe a: 2 Std. 45 min Infusion von Elektrollytlösung (1,2 ml.h⁻¹)

Gruppe b: 45 min Vorinfusion mit Elektrollytlösung. Dann 2 Std. Infusion von Fructose (1,5 g.kg⁻¹.h⁻¹)

Gruppe c: 45 min Vorinfusion von Elektrollytlösung. Dann 2 Std. Infusion von Fructose (2,5 g.kg⁻¹.h⁻¹)

Gruppe d: 45 min Vorinfusion von DL-Glycerin-3-phosphat (0,07 g.kg⁻¹.h⁻¹). Dann Infusion von Fructose (2,5 g.kg⁻¹.h⁻¹) + Glycerinphosphat (0,07 g.kg⁻¹.h⁻¹).

Das infundierte Volumen war immer 1,2 ml h⁻¹. Die Konzentrationsangaben bedeuten $\mu\text{Mol/g}$ Leberfrischgewicht.

Gruppe	Zahl der Unters.	Ratten- gewicht g	Leber- gewicht g	ATP	ADP	AMP	ATP+ADP +AMP	Lactat	Pyruvat	Lactat Pyruvat	Gesamt Phosphat	anorgan. Phosphat	
a	n=10	m	258	10,3	3,834	1,336	0,289	5,460	1,061	0,087	11,5	32,383	5,236
		s	23	1,5	0,396	0,139	0,057	0,338	0,917	0,060	3,7	2,961	0,545
b	n=10	m	259	11,6	3,097	1,204	0,288	4,589	1,479	0,109	15,4	31,130	5,425
		s	19	1,3	0,355	0,118	0,088	0,204	0,480	0,051	6,4	3,862	0,310
c	n=10	m	255	12,0	2,451	1,102	0,282	3,838	2,271	0,199	11,7	34,373	5,104
		s	18	1,6	0,351	0,157	0,061	0,365	0,557	0,057	2,2	3,279	0,619
d	n=12	m	253	11,2	2,510	1,090	0,293	3,892	2,637	0,210	13,9	38,500	5,696
		s	7	0,6	0,320	0,130	0,040	0,360	1,179	0,068	6,8	3,735	0,539

Tabelle 6:

Metabolit-Gesamtmengen in der Leber nach 2 Stunden Dauerinfusion

m = Mittelwert; s = Standardabweichung

Gruppen a, b, c, d wie in Tabelle 7.

Die angegebenen Werte bedeuten μMol in der Gesamtleber.

Gruppe	Zahl der Unters.	Ratten- gewicht g	Leber- gewicht g	ATP	ADP	AMP	ATP+ADP +AMP	Lactat	Pyruvat	Lactat Pyruvat	Gesamt Phosphat	anorgan. Phosphat	
a	10	m	258	10,3	39,280	13,746	2,976	56,002	10,417	0,860	11,5	321	52
		s	23	1,5	8,502	2,294	0,732	6,821	7,890	0,516	3,7	65	11
b	10	m	259	11,6	35,496	13,966	3,374	52,837	17,271	1,254	15,4	360	63
		s	19	1,3	3,583	2,484	1,248	4,931	6,422	0,625	6,4	61	8
c	10	m	255	12,0	29,362	13,171	3,354	45,887	26,760	2,333	11,7	410	61
		s	18	1,6	5,690	2,452	0,694	7,274	6,226	0,633	2,2	55	10
d	12	m	253	11,2	27,894	12,024	3,249	43,167	29,114	2,380	13,9	426	63
		s	7	0,6	4,238	1,600	0,500	5,197	12,484	0,682	6,8	48	6

- Als wesentlich muß zusammenfassend herausgestellt werden, daß
1. der Zusatz von Glycerin-3-phosphat in der angewandten Menge keinen Einfluß auf die bestimmten Parameter hat.
 2. Die Änderungen der Parameter sind deutlich größer bei der hohen Fructosedosierung.

Obwohl diese Änderungen in der Literatur als gesichert gelten, kann aus den unter "Methodik" angeführten Gründen (metabolische Abhängigkeit der einzelnen Parameter voneinander) eine Wahrscheinlichkeitsaussage nicht gemacht werden.

III. 2. 6-Stunden-Dauerinfusionen mit Fructose und DL-Glycerin-3-phosphat

Um das Verhalten des anorganischen Phosphates und des Gesamtphosphates im Blut, im Harn und in der Leber sowie das Verhalten der Lebermetabolite und die Ausscheidung des Glycerin-3-phosphates und des Glycerins im Harn bei Zufuhr von Fructose und Glycerinphosphat zu prüfen, wurden länger dauernde intravenöse Infusionen durchgeführt. Die in den Infusionen gewählten Dosierungen der zugeführten Substanzen lagen dabei im Gegensatz zu den 2-Stundeninfusionen im Bereich der Umsatzkapazität für diese Substanzen bei der Ratte (29,30).

Die Ratten, deren Körpergewichte im Mittel für die verschiedenen Gruppen zwischen 259 ± 22 g (n=12) und 267 ± 27 g (n=8) lagen, wurden mit folgenden Dosen über 6 Stunden infundiert:

- a. Gruppe der mit Fructose infundierten Ratten: (n=12)
 $0,75 \text{ g Fructose} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- b. Gruppe der mit Fructose und Glycerinphosphat infundierten Ratten: (n=12)
 $0,75 \text{ g Fructose} + 0,35 \text{ g DL-Glycerin-3-phosphat} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
- c. Vergleichsgruppe: (n=8)
gleiche Volumina physiologischer Elektrolytlösung
(0,83 % NaCl + 0,03 % KCl)
Das applizierte Volumen betrug jeweils $1 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$.

Blutentnahmen erfolgten vor Beginn der Infusion und in 2-Stundenabständen während der Infusion. Harnproben wurden in 2-Stundenportionen Spontanharn vor und während der Infusion mittels Sammelkatheter aufgefangen. Die Leberproben wurden unmittelbar nach Ende der Infusion entnommen.

III. 2.1. Blutbefunde

Der zeitliche Verlauf von Gesamtposphat, anorganischem Phosphat, gebundenem Phosphat sowie des Glucosespiegels im Blut unter Infusion von Fructose, Fructose + Glycerin-3-phosphat oder Elektrolytlösung ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Da die zu verschiedenen Zeiten gemessenen Werte nicht voneinander unabhängig sind, hätte ihr Vergleich mit dem Ausgangswert im t-Test für verbundene Stichproben nur descriptive Bedeutung. Da im Zusammenhang dieser Untersuchungen besonders das Verhalten des anorganischen Phosphats interessiert, wurde wie bei den in Tabelle 4 dargestellten Daten die Summe aller Differenzen gegen den Ausgangswert bestimmt und für Gruppe a (Fructose) und b (Fructose + Glycerin-3-phosphat) verglichen. Die Summenwerte für anorganisches Phosphat liegen bei Gruppe b statistisch auffällig (Irrtumswahrscheinlichkeit 2,5 %) höher als bei Gruppe a.

Die geringeren Unterschiede im Vergleich zu den in Tabelle 4 angegebenen Daten erklären sich durch die geringere Fructose-dosierung. In der Tat findet bei der hier angewandten Dosierung von $0,75 \text{ g Fructose kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auch kein Abfall des Phosphatspiegels gegenüber dem Ausgangswert statt. Bemerkenswert ist weiterhin, daß kein Anstieg des gebundenen Phosphats zu verzeichnen ist, was wiederum auf die rasche intravasale Spaltung des Phosphorsäureesters hinweist.

Die Blutglucosekonzentration veränderte sich unter der Infusion nur geringfügig, wobei der leichte Anstieg unter Fructose- bzw. Gemischinfusion wohl auf die Fructosegabe und nicht auf den Zusatz von Glycerin-3-phosphat zurückzuführen ist.

Tab. 7:

Blutwerte bei 6-Stunden-Dauerinfusionen

m = Mittelwerte, s = Standardabweichungen

Gruppe a: Infusion von Fructose: $0,75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ Gruppe b: Infusion von Fructose ($0,75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) + DL-Glycerin-3-phosphat ($0,35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)Gruppe c: Infusion von Elektrolytlösung ($1 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$)

Anzahl der Versuchstiere in Gruppe a und b je 12, in Gruppe c 8.

Gruppe		a (n = 12)				b (n = 12)				c (n = 8)			
Zeit (Std.)		0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
Gesamt-phosphat ($\mu\text{Mol/ml}$)	m	13,25	13,43	13,22	13,06	13,65	14,05	14,24	13,75	13,73	13,21	12,69	12,06
	s	0,70	0,80	0,751	1,063	0,975	0,896	1,181	1,284	0,396	0,646	0,844	0,750
anorgan. Phosphat ($\mu\text{Mol/ml}$)	m	2,38	2,63	2,68	2,74	2,45	3,29	3,53	3,40	2,55	2,54	2,50	2,31
	s	0,129	0,184	0,170	0,337	0,197	0,648	0,845	0,858	0,230	0,280	0,280	0,130
gebundenes Phosphat ($\text{P}_{\text{ges}} - \text{P}_i$) ($\mu\text{Mol/ml}$)	m	10,86	10,86	10,68	10,35	11,20	10,79	10,73	10,31	11,06	10,68	10,19	9,74
	s	0,713	0,810	0,773	0,977	0,847	0,817	0,910	1,057	0,481	0,503	0,800	0,759
Glucose (mg/100 ml)	m	90	94	96	97	88	90	92	94	90	93	82	87
	s	10	7	6	7	8	8	10	14	10	10	9	10

III. 2.2. Harnbefunde

Mittelwerte und Standardabweichungen der im Harn bestimmten Substanzen sind in Tab. 8, die Ergebnisse des t-Tests für Mittelwerte nicht verbundener Stichproben sind in Tab. 8 a für die Gesamtausscheidungsmengen dargestellt.

Die zu den verschiedenen Zeiten ausgeschiedenen Harnvolumina waren bei allen Gruppen sehr unterschiedlich. Die Gesamtausscheidungsmenge unter Infusion war am höchsten bei den fructoseinfundierten Ratten, am niedrigsten bei den Ratten, die mit Fructose und Glycerin-3-phosphat infundiert wurden. Das Bestimmtheitsmaß r^2 zeigte, daß zwischen ausgeschiedener Substanzmenge und Harnvolumen keine enge Beziehung bestand. Für L-Glycerin-3-phosphat stieg die Ausscheidung unter Infusion sowohl von Fructose wie von Elektrolytlösung an, deutlicher unter Fructose wie unter Elektrolytgabe. Unter Zusatz von Glycerin-3-phosphat zur Fructoseinfusion lag die Ausscheidung um 2 Zehnerpotenzen höher. Es erschienen im Mittel $9,1 \pm 5,1 \%$ ($n=12$) der zugeführten DL-Glycerin-3-phosphatmenge wieder im Harn. Da nur die L-Form des Glycerinphosphates enzymatisch bestimmt werden kann, wurde angenommen, daß D- und L-Form in gleichem Umfang im Harn erscheinen. Dies wurde dadurch bestätigt, daß die Ausscheidung an gebundenem Phosphat im Harn unter DL-Glycerin-3-phosphatinfusion doppelt so hoch war wie die Ausscheidung des L-Glycerinphosphates, während unter Fructose oder Elektrolytinfusion kein gebundenes Phosphat im Harn erschien. Es läßt sich daraus schließen, daß der Anteil des nicht als L-Glycerinphosphat im Harn vorliegenden gebundenen Phosphates dem D-Glycerin-phosphat zuzurechnen ist. Dies bestätigt zusätzlich die oben unterstellte Behauptung, daß D- und L-Form des Glycerinphosphates in gleichem Maße von den Phosphatasen des Blutplasmas gespalten werden, da, wäre dies nicht der Fall, eine der beiden Formen vermehrt im Harn erscheinen müßte.

Tabelle 8:

Ausscheidung im Harn bei 6-Stunden-Dauerinfusionen

m = Mittelwert, s = Standardabweichung

Gruppen a, b und c wie in Tabelle 9

Gruppe	a (Fructose) n = 12				b (Fructose + Glycerin-P)n=12				c (Elektrolytlösung) n=8							
Zeitraum (Std.)	0	0-2	2-4	4-6	0	0-2	2-4	4-6	0	0-2	2-4	4-6	0-6			
Harnmenge ml	m s	1,5 1,23	4,4 2,71	3,8 1,46	11,3 4,8	1,8 2,71	2,6 2,04	2,5 0,74	3,4 1,25	8,7 2,5	1,1 0,68	5,1 1,87	2,3 1,54	3,0 1,41	10,3 3,02	
L-Glycerin- 3-phosphat	m s	0,095 0,035	0,120 0,168	0,224 0,231	0,493 0,508	0,837 0,868	0,048 0,045	13,291 9,951	32,099 20,138	34,040 18,621	75,6 40,212	0,015 0,028	0,056 0,053	0,151 0,137	0,209 0,111	0,396 0,209
Glycerin	m s	0,156 0,066	1,423 1,018	1,606 0,989	2,140 1,791	5,169 3,437	0,144 0,034	6,643 5,714	13,740 11,687	12,834 7,345	32,11 23,01	0,071 0,039	0,167 0,103	0,123 0,054	0,161 0,047	0,435 0,151
Gesamt- Phosphat	m s	7,2 7,3	60,8 47,7	96,9 49,0	150,8 78,3	309 157,2	5,6 4,6	183,6 124,3	47,67 216,9	677 146,2	1302 387,6	13,9 10,9	104,1 48,7	178,6 69,6	209,2 64,1	470 152,2
amorg. Phosphat	m s	8,2 9,1	64,2 55,1	94,9 48,8	144,6 73,0	304 160,9	7,0 7,7	161,50 112,8	426,7 198,9	598,6 142,3	1160 367	15,8 11,8	104,8 47,5	174,4 60,1	208,2 59,9	466 141,7
Differenz Gesamt- amorg.-P	m s						24,7 17,5	49,9 39,2	78,4 66,9	147 108						

Tabelle 8 a:

Statistischer Vergleich der Gesamtausscheidung im Harn bei den in Tabelle dargestellten Gruppen t-Test für nicht verbundene Stichproben.

Gruppe a, b und c wie in Tabelle

Zeichen: 0 = nicht signifikant

s = signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit 1 %)

Parameter	Harnmenge ml/6 ^h	L-Glycerin-3-P uMol/6 ^h	Glycerin uMol/6 ^h	anorg. Phosphat uMol/6 ^h	Gesamt-Phosphat uMol/6 ^h
a mit b	0	s	s	s	s
b mit c	0	s	s	s	s

Die Ausscheidung von Glycerin stieg sowohl bei Infusion von Fructose als auch bei Infusion von Fructose + Glycerin-phosphat im Verlauf des Versuches an, lag aber bei Zusatz von Glycerin-phosphat etwa 6-fach höher. Dies ist ebenfalls ein deutlicher Hinweis auf die intravasale Spaltung von Glycerinphosphat. Die durchschnittliche Ausscheidung des Glycerins betrug $6,9 \pm 4,7 \%$ ($n=12$) des im Glycerinphosphat zugeführten Glycerins. Die Glycerinausscheidung bei der Glycerin-3-phosphat erhaltenden Gruppe ist gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Die Ausscheidung von anorganischem Phosphat und Gesamtphosphat stieg während der Infusion im zeitlichen Verlauf an. Die ausgeschiedenen Mengen an anorganischem Phosphat und Gesamtphosphat waren bei den Kontrolltieren und den mit Fructose infundierten Tieren in den Absolutwerten identisch. Bei den mit Fructose + DL-Glycerin-3-phosphat infundierten Tieren war eine Differenz zwischen anorganischen und gesamtem Phosphat festzustellen, die - wie bereits erwähnt - auf die Ausscheidung von Glycerinphosphat zurückzuführen ist. Im Vergleich der Gruppen b mit a bzw. c war die Phosphatausscheidung bei den gemischinfundierten Ratten deutlich gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe erhöht.

Tabelle 9:

Metabolitkonzentrationen in der Leber nach 6-Stunden-DauerinfusionGruppe a: Infusion von Fructose: $0,75 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ Gruppe b: Infusion von Fructose: $(0,75 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}) + \text{DL-Glycerin-3-phosphat } (0,35 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1})$

Gruppe c: Infusion von Elektrolytlösung.

m = Mittelwert; s = Standardabweichung. Konzentrationsangaben in $\mu\text{Mol/g}$ Leberfrischgewicht.

Gruppe	Zahl der Unters.	Ratten- gewicht g	Leber- gewicht g	ATP	ADP	AMP	ATP+ADP+AMP	L-G-3-P	Glycerin	Ges.P.	anorg.P.	Differenz $P_g - P_i$
10	m	259	9,5	3,536	1,297	0,351	5,184	0,547	0,040	37,59	6,409	31,266
	s	16	0,87	0,404	0,157	0,079	0,371	0,091	0,059	5,385	0,857	4,749
12	m	259	9,3	3,408	1,418	0,435	5,260	0,849	0,137	38,15	6,904	31,066
	s	22	1,43	0,464	0,188	0,121	0,495	0,236	0,034	9,545	1,142	8,870
8	m	267	9,3	3,441	1,441	0,409	5,290	0,608	0,022	35,74	6,48	29,264
	s	27	1,0	0,558	0,313	0,155	0,380	0,268	0,029	2,80	0,86	2,557

III. 2.3. Metabolitgehalte der Leber

In Tab. 9 sind Mittelwerte und Standardabweichungen der in der Leber bestimmten Metabolite angegeben. Bezüglich der statistischen Auswertung gilt die unter "Methodik" angegebene Einschränkung. Im Gegensatz zu hochdosierten Fructoseinfusionen war kein Anstieg des Lebergewichts nachweisbar. Daher ergaben sich keine Unterschiede bei Betrachtung der Metabolitkonzentration bzw. - gesamtmenge.

Auch für die Adenosinnucleotide ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Die Konzentrationen an Glycerin und Glycerinphosphat stiegen in der Leber der Tiere an, die Glycerin-3-phosphat erhalten hatten. Der Anstieg des Gesamtphosphates, des L-Glycerin-3-phosphates und des Glycerins ist durch Anhäufung von L-Glycerin-3-phosphat und anderer phosphorylierter Metabolite in der Leber erklärbar, wie sie auch unter Glycerininfusion auftritt (52).

Beim anorganischen Phosphat und gebundenen Phosphat ergaben sich keine Unterschiede, das Gesamtphosphat war unter Fructose- bzw. Gemischinfusion in der Leber erhöht.

Diskussion

Unter intravenöser wie enteraler Applikation von Fructose Xylit und Sorbit wird vielfach ein Absinken des Gehaltes an anorganischem Phosphat im Blut und in den Geweben und eine Verminderung der Adenosinnucleotide in verschiedenen Organen (Leber, Niere) beschrieben. Mit den hier durchgeführten Untersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit Glycerin-3-phosphat in der Lage ist, diese Veränderungen im Rahmen der parenteralen Ernährung auszugleichen.

A. I. Ausgleich des anorganischen Phosphates im Blut

Unter hochdosierten Gaben von Fructose - sei es in Form von Stoßbelastung oder als Dauerinfusion - kommt es im Blut zu einem vorübergehenden Absinken des anorganischen Phosphates (7,9,12). Im Verlauf zeigt sich nach einem initialen Abfallen der Konzentration an anorganischem Phosphat unter Stoßbelastung nach 30 bis 45 Minuten, unter Dauerinfusion ca 30 Minuten nach Infusionsende, ein spontaner steiler Anstieg der Phosphatkonzentration im Blut (7,9,27). Der initiale Phosphatabfall wird im Zusammenhang mit dem Absinken der Adenosinnucleotide im Sinne einer Verschiebung des anorganischen Phosphates bei intrazellulärer Anhäufung phosphorylierter Metabolite des Fructosestoffwechsels gesehen. Die Befunde verschiedener Autoren (4,5,15,28,31,32) und der Anstieg des Gesamtphosphates in der Leber belegen diese Annahme. Wie unter dem Einfluß von Fructose kommt es unter hochdosierter Xylit- oder Sorbitgabe zu einer Senkung des Phosphatspiegels im Blut. Vereinzelt kann dies sogar bei Gabe großer Glucosemengen festgestellt werden (13).

Applikation von Glycerin-3-phosphat kann ein fructosebedingtes Absinken des anorganischen Phosphates im Blut verhindern. Allerdings wird der Phosphatspiegel dabei nicht immer konstant gehalten. Wird die Glycerinphosphatdosis so gewählt, daß der initiale Phosphatabfall vermieden wird, kommt es terminal zu einer Überhöhung des Phosphatspiegels im Blut. Wird wenig Glycerinphosphat der Fructose zugesetzt um den terminalen Anstieg

so gering wie möglich zu halten, dann genügt die Dosis nicht um den initialen Phosphatabfall zu vermeiden.

Da anorganisches Phosphat protrahiert aus Glycerin-3-phosphat freigesetzt wird, kann durch Infusion von geringen Mengen Glycerin-3-phosphat über 45 Minuten vor Beginn der Fructoseapplikation der initiale Phosphatabfall vollständig, der terminale Phosphatanstieg weitestgehend vermieden werden. Die Menge des zuzuführenden Glycerinphosphates kann auf diese Weise ebenfalls sehr gering gehalten werden. So genügt zum Ausgleich des initialen Phosphatabfalles durch Fructose eine Zufuhr von Glycerin-3-phosphat in einem Molaritätsverhältnis von 65:1.

II. Ausgleich des anorganischen Phosphates in der Leber

Unter Stoßbelastung mit Fructose sinkt der Gehalt an anorganischem Phosphat in der Leber initial ab. Diese Phosphatverminderung in der Leber tritt rascher ein als die im Blut, wird aber auch rascher spontan ausgeglichen (1,2,4,5). Unter hochdosierter Fructosedauerinfusion ist der Gehalt an anorganischem Phosphat in der Leber vermindert, der Gehalt an Gesamtphosphat erhöht.

Durch gleichzeitige Zufuhr von Glycerin-3-phosphat läßt sich anorganisches wie gesamtes Phosphat in der Leber anheben.

Dies zeigt, daß Glycerin-3-phosphat in der Lage ist den Gehalt des Blutes wie der Gewebe sowohl an anorganischem wie gesamten Phosphat zu erhöhen.

III. Einfluß des Glycerin-3-phosphates auf den Adenosinnucleotidgehalt der Leber

Unter Fructosestoßbelastung nimmt der Adenosinnucleotidgehalt der Leber ab (1-9), unter Fructosedauerinfusion ist dieser erst nach Überschreiten der Umsatzkapazität der Leber für Fructose herabgesetzt. Der Abfall der Leberadenosinnucleotide nach Fructosegabe ist dosisabhängig (1-6) und nur vorübergehend nachzuweisen (1).

Neben der Leber ist die Niere betroffen, in der Muskulatur sind die Adenosinnucleotide nicht vermindert (2,33). Der unter Fructosegabe festzustellende Harnsäureanstieg im Blut (1-9, 27, 31,34-39) wird mit der Verminderung der Adenosinnucleotide in Kausalzusammenhang gebracht. Verschiedene Untersucher nehmen an, daß dieser Harnsäureanstieg durch einen Abbau der Adenosinnucleotide durch die 5-Nucleotidase, AMP-Deaminase und Adenosindeaminase bedingt ist. 5-Nucleotidase wird aber durch ATP, AMP-deaminase durch ATP und anorganisches Phosphat gehemmt (4). Sinkt der ATP-Gehalt und - noch bedeutender - der Spiegel des anorganischen Phosphates in den Geweben - z.B. durch hochdosierte Fructosegabe - werden diese Enzyme aktiviert und es kommt zum Abbau von AMP zu Vorstufen, die nicht phosphoryliert werden können und damit dem Prozess der Energierückgewinnung entzogen werden.

Da die AMP-abbauenden Enzyme durch Phosphatmangel besonders stark beeinflußt werden (2,4), müßte Phosphatsubstitution den Adenosinnucleotidabbau zumindest teilweise verhindern. Bode et al. (5) konnten dies bei Zufuhr äquimolarer Mengen Fructose und anorganischen Phosphates - leider fehlen genauere Angaben über die verwendete Substanz - zeigen. So konnten durch die Phosphatsubstitution zwar den ATP-Abfall nicht verringern, doch wurde der Abfall der Gesamtadenosinnucleotide abgeschwächt.

In den vorgelegten Versuchen läßt sich ein Einfluß des Glycerin-3-phosphates auf die Leberadenosinnucleotide nicht nachweisen. Dies ist jedoch nicht auf die Unwirksamkeit des Glycerin-3-phosphates als Phosphatspender zurückzuführen, sondern auf die hier angewendete geringe Dosierung. Diese reicht zum Ausgleich des anorganischen Phosphates im Blut und in Geweben. Den von Bode et al. verwendeten Phosphatdosierungen vergleichbare Glycerinphosphatzufuhren führen zu erheblichen Steigerungen des anorganischen Phosphates in Blut und Leber.

Ein Ausgleich des Adenosinnucleotidgehaltes ist im Blick auf Zellschäden bei ATP-Mangel nicht unbedingt erforderlich. Histopathologische Untersuchungen (40) zeigen, daß eine längeranhaltende

Verringerung der Adenosinnucleotide auf 50% der Ausgangswerte keine ultrastrukturellen Veränderungen in der Zelle hervorrufen. Daneben ist als sicher anzusehen, daß der Abbau der Adenosinnucleotide begrenzt ist (1,2) und bestimmte Konzentrationen nicht unterschritten werden. Dies wird auf Hemmung des Abbaus durch AMP-Mangel (1) oder auf gleichzeitig durch Fructose gesteigerte de novo Synthese der Adenosinnucleotide zurückgeführt (33).

Auch mit Blick auf den Harnsäureanstieg ist ein Ausgleich der Adenosinnucleotide nicht unbedingt erforderlich, da nach Untersuchungen von Förster et al. (35,36,37) der Harnsäureanstieg nur vorübergehend ist und die obere Normgrenze nur geringfügig übersteigt. Nach Heuckenkamp et al. (9) ist der Harnsäureanstieg unter Fructosegabe bei Gichtpatienten weniger deutlich als bei Normalpersonen.

IV. Einfluß des Glycerin-3-phosphates auf Lactat und Pyruvat in der Leber und auf die Blutglucosekonzentration

Lactat und Pyruvat steigen unter Fructoseinfusion (4,5,28), aber auch unter Infusion anderer Zuckeraustauschstoffe (41), in der Leber und im Blut (7,9,31,42,43) deutlich an.

Zusätzlich zu Fructose verabreichtes Glycerin-3-phosphat beeinflusst den Lactat- und Pyruvatgehalt der Leber in keiner Weise. Der Einfluß des Glycerin-3-phosphates auf den Lactat- und Pyruvatspiegel im Blut muß noch geprüft werden.

Die Blutglucosekonzentration steigt unter Fructosebelastung an (4,28,32,31,38) was auf eine durch vermehrtes Substratangebot gesteigerte Gluconeogenese zurückgeführt wird. Heinz und Jung-hänel (28) fanden ein Glucosegefälle zwischen Leber und Blut von der 5. bis zur 20. Minute nach Fructosegabe.

Durch Glycerin-3-phosphat in den hier verwendeten Dosierungen wird der Blutglucosespiegel nicht beeinflusst, sei es bei alleiniger Verabreichung oder in Kombination mit Fructose.

B. Die Ergebnisse der Dauerinfusionsversuche zeigen insgesamt - ebenso wie die Stoßbelastungen - daß Glycerin-3-phosphat zur Phosphatsubstitution im Rahmen der parenteralen Ernährung angewendet werden kann.

Mit den in vitro-Versuchen wurde Ort und Art der Phosphatfreisetzung aus den organischen Phosphorsäureestern untersucht.

I. Intravasale Spaltung der organischen Phosphorsäureester

Wie aus den vorgelegten Untersuchungsbefunden hervorgeht wird Glycerin-3-phosphat nach Stoßinjektion und unter Dauerinfusion rasch und vollständig aus dem Blut eliminiert. Diese hohe Elimination kann weder durch die renale Ausscheidung allein noch durch ein Eindringen in die Gewebe erklärt werden, was früher versucht wurde (44,45). Angaben aus der Literatur (24,25), die ein Eindringen von organischen Phosphorsäureestern nur unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei Bakterien nach vorheriger Adaptation an den Phosphorsäureester als Substrat (25), beschreiben und die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen, daß ein Eindringen der organischen Phosphorsäureester auszuschließen ist, da diese sehr rasch intravasal gespalten werden.

Dies zeigt sich bei den in vitro Inkubationen besonders bei Vergleich der Inkubationen mit Plasma und den Inkubationen mit Vollblut. Inkubiert man Äquimolare Mengen der Phosphorsäureester mit gleichen Volumina Plasma und Vollblut, so ist eine geringere Phosphatfreisetzung im Vollblut festzustellen. Korrigiert man diese Werte um den Hämatokrit, so erhält man Werte, die mit den Werten der Phosphatfreisetzung im Plasma übereinstimmen.

II. Spaltung der organischen Phosphorsäureester durch unspezifische Phosphatasen des Plasmas

Da in den in vitro-Inkubationsversuchen die verschiedenen verwendeten organischen Phosphorsäureester unspezifisch gespalten wurden, lag die Vermutung nahe, daß ein diese Verbindungen un-

spezifisch hydrolysierendes Enzym, z.B. die alkalische und die saure Phosphatase, für die Phosphatfreisetzung aus diesen Verbindungen verantwortlich ist. Die geringe Substratspezifität der alkalischen und sauren Phosphatase ist aus der Literatur bekannt (46-50). So spalten diese Enzyme organische Phosphorsäureester ebenso wie Fluorophosphate, Pyrophosphate, Adenosinphosphate, Thiophosphorsäureester. Die Spaltungsaktivität ist dabei pH-abhängig (47,50). Dies erklärt auch die hier vorgelegten Befunde, die zeigen, daß im Plasma die Spaltung der organischen Phosphorsäureester auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase zurückzuführen ist, während die saure Phosphatase fast keinen Anteil an der Spaltung dieser Verbindungen im Blut hat. Spaltungsversuche mit gereinigter saurer Phosphatase im entsprechenden optimalen pH-Bereich zeigen eine der alkalischen Phosphataseaktivität im Plasma vergleichbare Spaltungsaktivität.

Eine vollständige Spaltung der Phosphorsäureester in den in vitro-Inkubationen war nicht zu erwarten, da die alkalische Phosphatase durch ihr Produkt, das anorganische Phosphat, gehemmt wird (48). Da unter in vivo-Bedingungen das anorganische Phosphat im Phosphatmangel rasch verbraucht wird, ist hier nicht mit einer Hemmung der alkalischen Phosphatase zu rechnen. Man könnte sogar spekulativ annehmen, daß der terminal bei der parenteralen Ernährung ansteigende anorganische Phosphatgehalt eine weitere Freisetzung des anorganischen Phosphates hemmt und damit eine Überschwemmung des Organismus im Gegensatz zur Zufuhr von anorganischen Phosphatverbindungen vermieden wird. Die alkalische Phosphatase wirkt also regulierend auf den anorganischen Phosphatspiegel des Blutes.

Die hier durchgeführten in vitro-Inkubationen wurden mit Rattenplasma durchgeführt. Für die Anwendung von organischen Phosphorsäureestern als Phosphatspender beim Menschen ist die ausreichende Aktivität der alkalischen Phosphatase im Blut erforderlich. Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase im Rattenserum wurde mit Werten zwischen 46 und 103 mU/ml nach der 30-Minuten Endpunktbestimmung gemessen. Sie ist der in der Literatur (51) beschrie-

benen Aktivität der alkalischen Phosphatase im menschlichen Serum, deren Normalwert nach dieser Bestimmungsmethode mit 30-50 mU/ml angegeben wird, durchaus vergleichbar.

C. Zur Toxizität des Glycerin-3-phosphates

Nach mündlichen Angaben von Heidenreich (Aachen) ist die Toxizität des Glycerin-3-phosphates gering einzuschätzen. Nach seinen Angaben können Ratten bis zu 2 g dieser Substanz pro kg Körpergewicht pro Tag bedenkenlos gegeben werden. In den vorliegenden Untersuchungen, bei denen diese Dosierung teilweise sogar überschritten wurde (z.B. 6-Stunden-Dauerinfusionen), wurden keine klinischen Zeichen einer Intoxikation bei den Versuchstieren bemerkt. Soweit die bestimmten Parameter es zulassen waren auch keine objektiven Zeichen einer Intoxikation feststellbar. Demnach sind aus toxikologischer Sicht keine Einwände gegen eine Anwendung von Glycerin-3-phosphat zur Phosphatsubstitution im Rahmen der parenteralen Ernährung zu erwarten, zumal bereits geringe Zufuhren hinreichend wirksam sind. Eine genaue toxikologische Prüfung des Glycerin-3-phosphates mit Feststellung der LD_{50} und toxischer Blutspiegel muß dies noch erweisen.

Zusammenfassung

Organische Phosphorsäureester können zur Phosphatsubstitution im Rahmen der parenteralen Ernährung genutzt werden. Dies ist am Glycerin-3-phosphat nachgewiesen und kann für andere organische Phosphorsäureester in hohem Maße angenommen werden. Diese Aussage beruht auf den folgenden hier vorgelegten Ergebnissen:

1. Glycerin-3-phosphat wird nach parenteraler Zufuhr rasch aus dem Blut eliminiert. Trotz hoher prozentualer Ausscheidung im Harn nach Stoßbelastung kann die rasche Elimination der Substanz aus dem Blut der Ratte nicht allein durch die renale Ausscheidung erklärt werden. Unter den Bedingungen der Dauerinfusion übersteigt die metabolische Elimination die renale Ausscheidung bei Weitem. In jedem Falle steigt der Gehalt

des Blutes und der Leber an anorganischem Phosphat deutlich an, was auf eine Phosphatfreisetzung aus Glycerin-3-phosphat zurückzuführen ist.

2. Die Utilisation des Glycerin-3-phosphates erfolgt durch Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung. Geschwindigkeit und Ausmaß der Spaltung reichen aus um eine deutliche, fructoseinduzierte Senkung des anorganischen Phosphates im Blut und in der Leber der Ratte auszugleichen. Bei Gabe geringer Glycerinphosphatmengen muß allerdings ca 45 Minuten vor Beginn der Kohlenhydratgabe mit der Applikation von Glycerin-3-phosphat begonnen werden, um einen initialen Abfall des anorganischen Phosphates im Blut vollständig zu vermeiden. Da nur so eine terminale Überhöhung des anorganischen Phosphatgehaltes im Blut und in den Geweben, die spontan unter Kohlenhydratgabe auftritt, weitgehend verhindert werden kann, ist die Gabe geringer Glycerinphosphatmengen in dieser Weise zu empfehlen.
3. Die Freisetzung des anorganischen Phosphates aus organischen Phosphorsäureestern erfolgt im Blutplasma. Für das Eindringen dieser Substanzen ergibt sich in den vorliegenden Versuchen kein Hinweis.
4. Das für die intravasale Hydrolyse der organischen Phosphorsäureester verantwortliche Enzym ist die im Serum vorkommende alkalische Phosphatase. Sie setzt aus Glycerin-3-phosphat rasch und vollständig anorganisches Phosphat frei. Die Spaltung der Phosphorsäureester erfolgt dabei unspezifisch. Dabei wird weder zwischen D- und L-Formen (nach den Befunden der in vivo-Versuche), noch zwischen Verbindungen mit unterschiedlicher Position der Phosphorsäureester an den C-Atomen unterschieden (nach Befunden der in vitro-Inkubationen).
5. Der fructosebedingte Abfall der Adenosinnucleotide in der Leber läßt sich unter den gewählten Versuchsbedingungen und Dosierungen nicht ausgleichen. Dies ist vermutlich auf eine zu geringe Dosierung zurückzuführen.

6. Lactat und Pyruvat in der Leber, sowie Glucose im Blut, die sich wie bekannt unter Fructoseinfusionen verändern, werden durch Zusatz von Glycerin-3-phosphat nicht weiter meßbar beeinflusst.

A N H A N G m i t A B B I L D U N G E N

Zeichenerklärung zu den Abbildungen

- 1) C = Konzentration im Blut
- 2) $\dot{C}$ = Änderung der Konzentration im Blut
- 3) C_a = Menge der im Ansatz freigesetzten Substanz
- 4) P_i = anorganisches Phosphat (immer angegeben in μMol)
- 5) t = Zeit (immer angegeben in Minuten)

L-Glycerin-3-phosphat

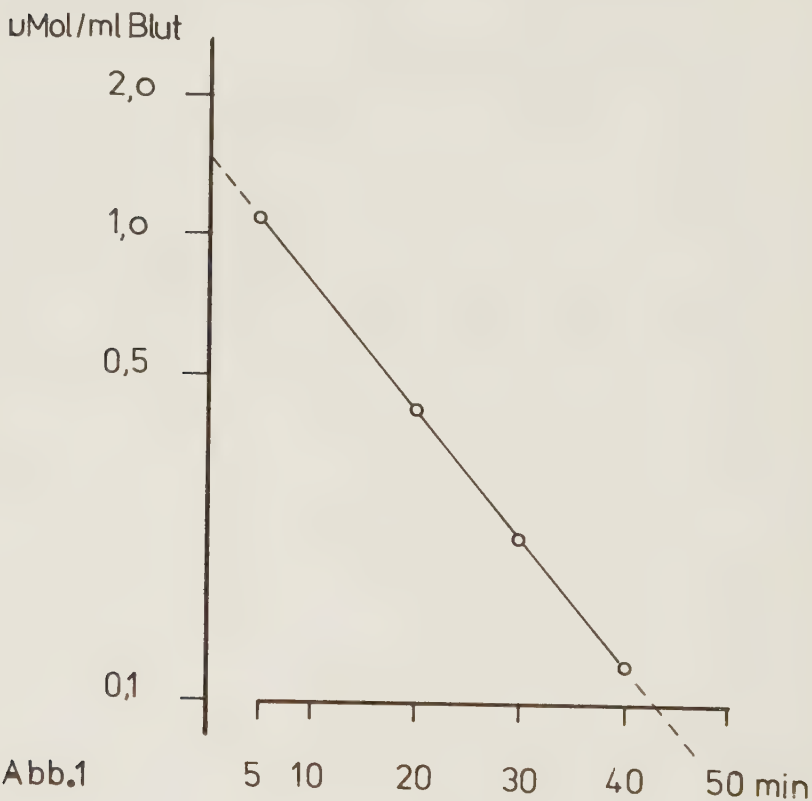
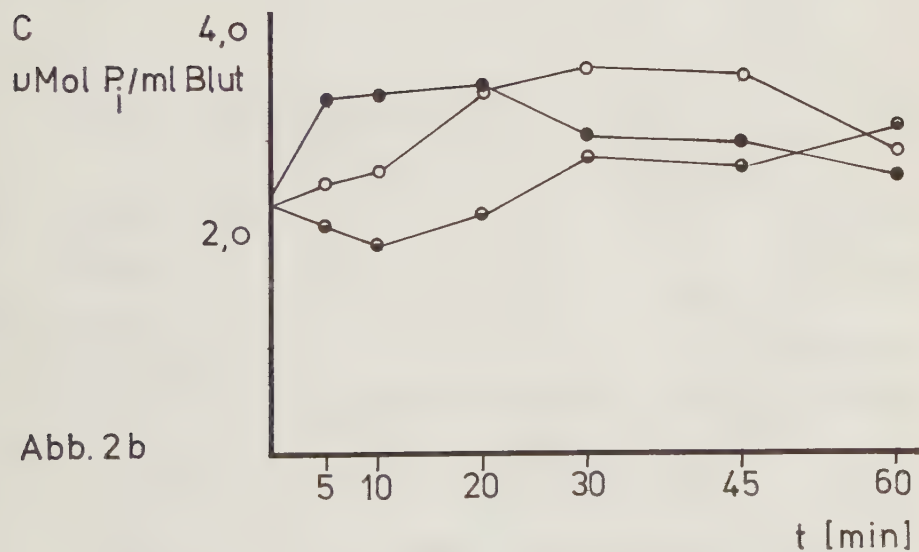
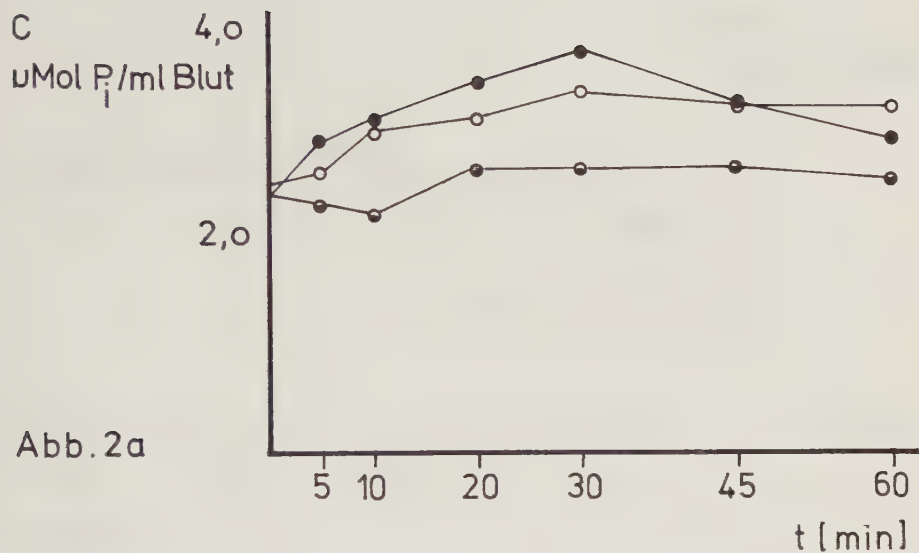


Abb.1

Abb. 1 Elimination von L-Glycerin-3-phosphat aus dem Blut einer Ratte nach i.v. Stoßbelastung mit DL-Glycerin-3-phosphat. Halblogarithmische Darstellung.



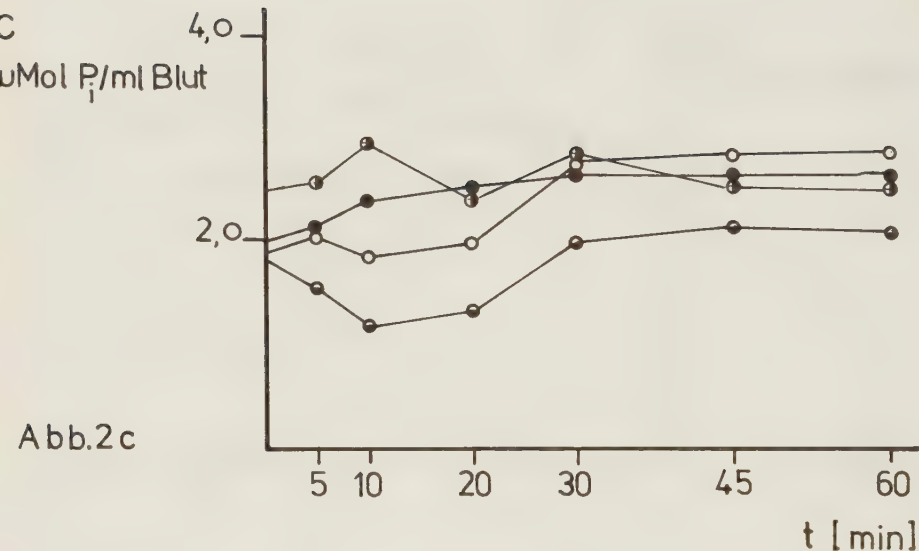


Abb. 2 a - c

Anorganisches Phosphat im Blut nach Stoßbelastung mit Fructose, DL-Glycerin-3-phosphat und Gemisch aus beiden Substanzen.

●—●—●	anorganisches Phosphat nach Stoßbelastung mit Fructose				
●—●—●	"	"	"	"	" DL-Glycerin-3-phosphat
○—○—○	"	"	"	"	" Fructose und
"	"	"	"	"	" DL-Glycerin-3-phosphat
●—●—●	NaCl-KCl-Lösung.				

Dosierungen: Fructose DL-Glycerin-3-phosphat

in Abb. 2 a 1 mMol 0,5 mMol

in Abb. 2 b 2 mMol 0,5 mMol

in Abb. 2 c 2 mMol 0,15 mMol

die Substanzen werden in 1 ml Volumen gegeben.



Abb. 3 a - c

Phosphatabspaltung aus einigen Phosphorsäureestern mittels

Vollblut



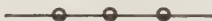
Blutplasma (heparinisiert)



alkalischer Phosphatase



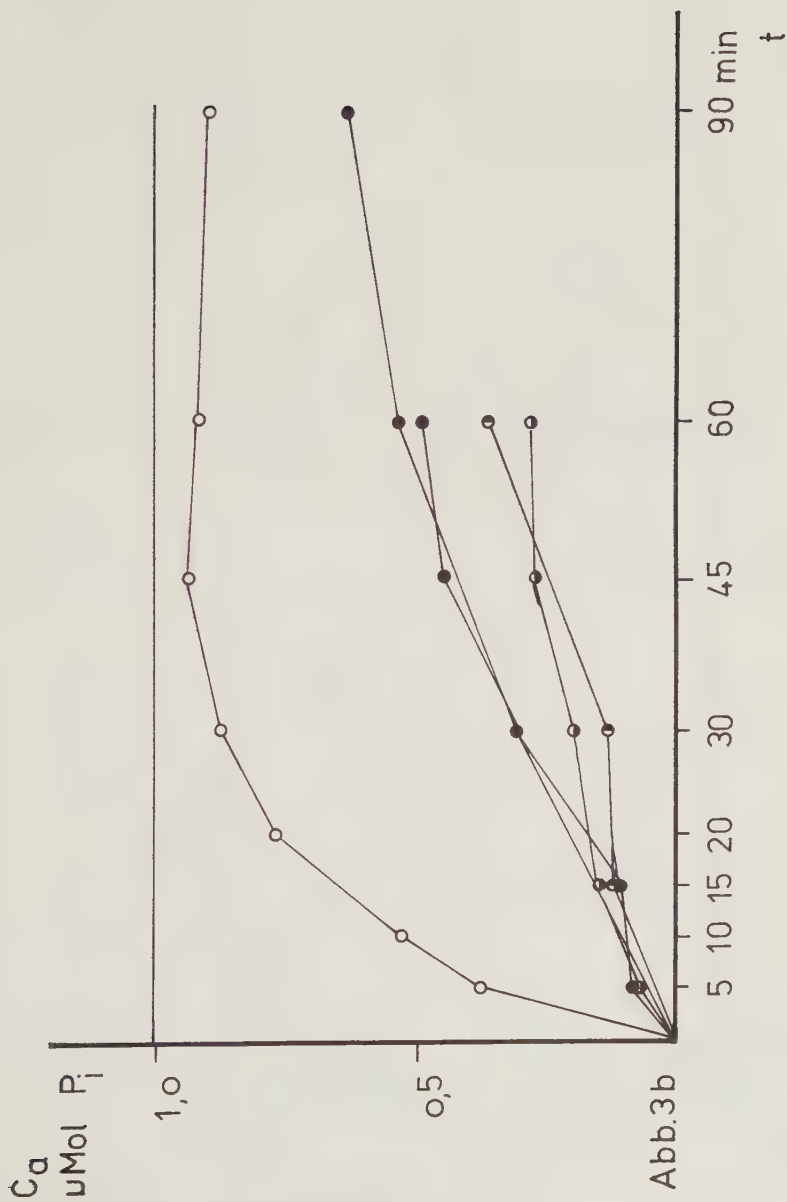
saurer Phosphatase

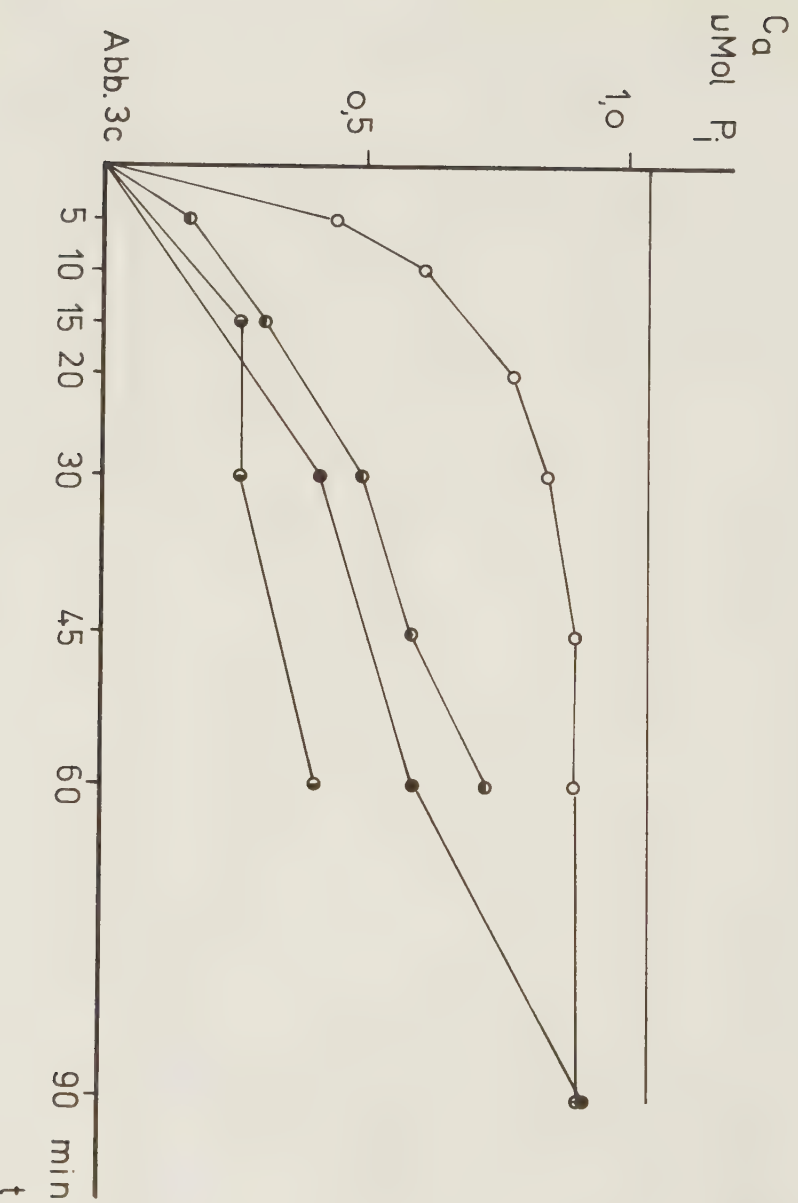


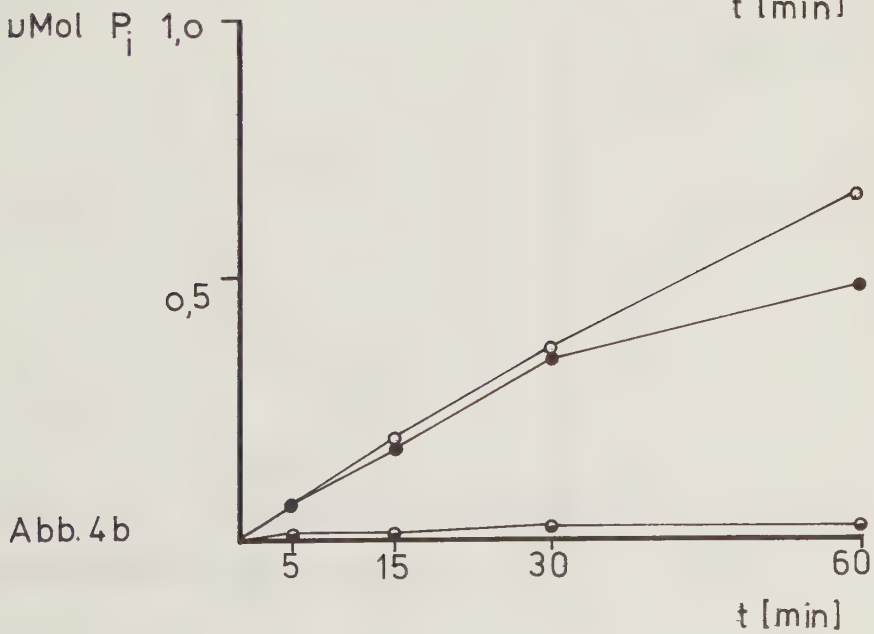
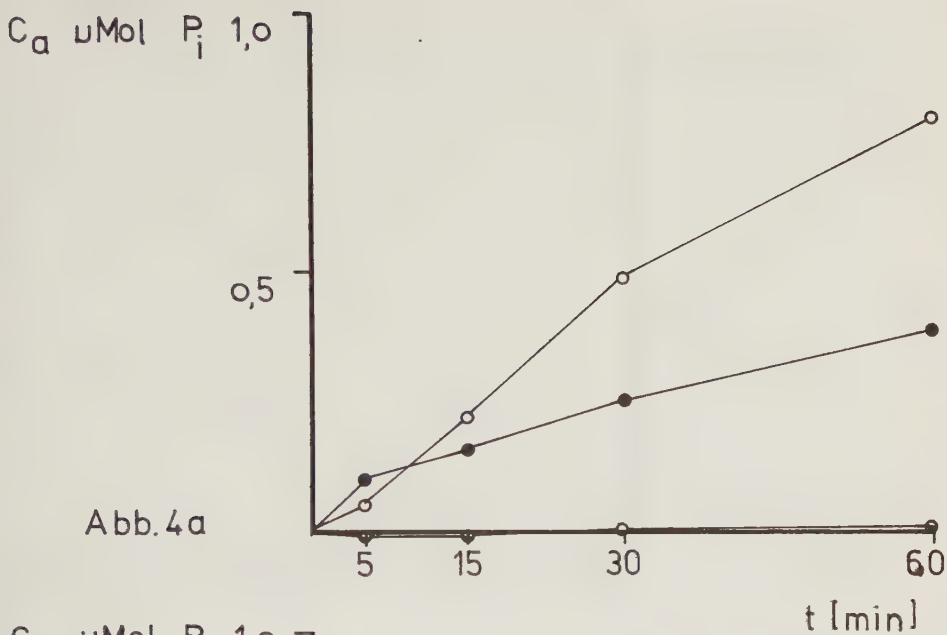
Verwendete Phosphorsäureester in Abb. a = DL-Glycerin-3-phosphat,

Abb. b = DL-Glycerin-2-phosphat, Abb. c = Gluconat-6-phosphat in μMol

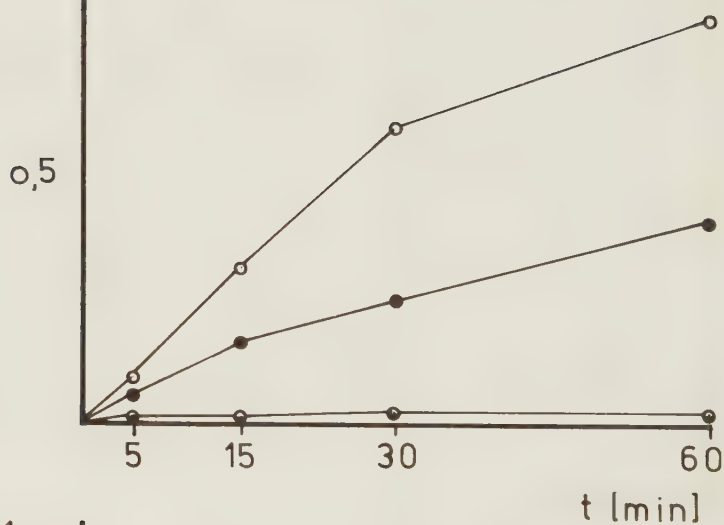
Dargestellt ist die Zunahme des anorganischen Phosphates im zeitlichen Verlauf nach Abzug des O-Wertes.



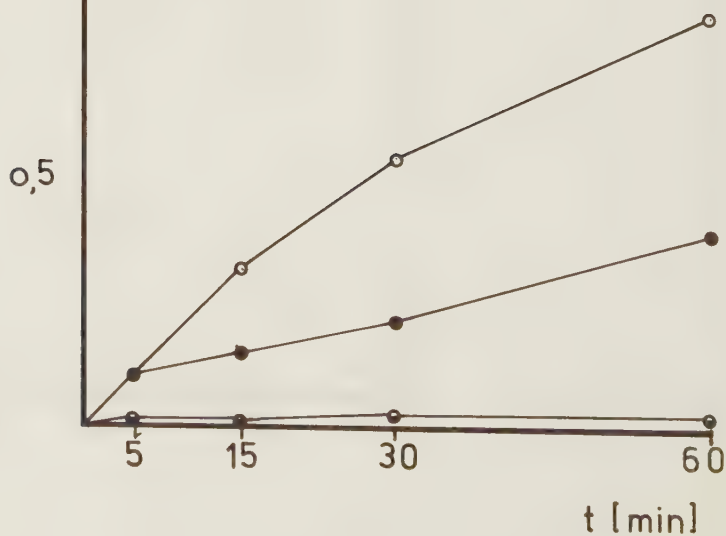




C_d μMol P_i 1,0



C_d μMol P_i 1,0



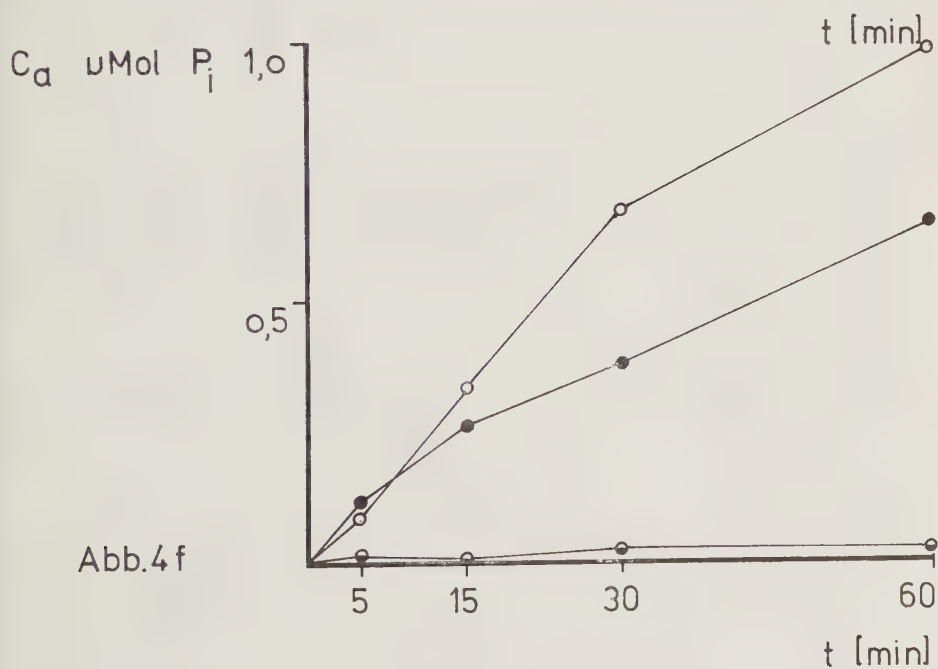
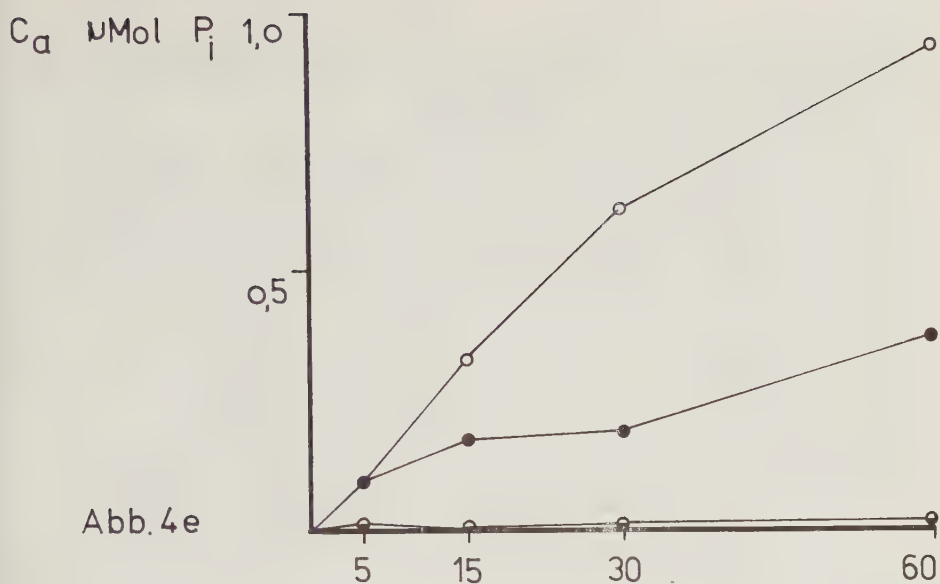
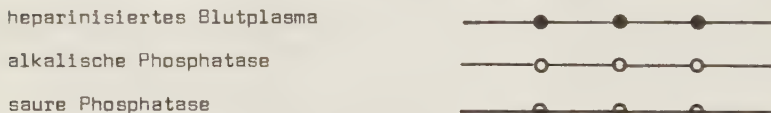


Abb. 4 a - f

Phosphatabspaltung aus Phosphorsäureestern mittels heparinisiertem Blutplasma und gereinigten Enzympräparaten.

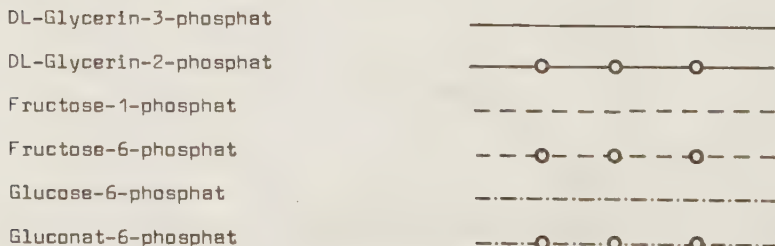
Dargestellt ist die Zunahme des anorganischen Phosphates in μMol im zeitlichen Ablauf nach Abzug des 0-Wertes. Das Substratangebot pro Ansatz war gleich. Die Aktivitäten der gereinigten Enzyme entsprachen den im Plasma bestimmten Enzymaktivitäten; die Ansätze hatten ein pH von 7,4



Verwendete Phosphorsäureester in Abb. 4 a = DL-Glycerin-3-phosphat, Abb. 4 b = DL-Glycerin-2-phosphat, Abb. 4 c = Fructose-1-phosphat, Abb. 4 d = Fructose-6-phosphat, Abb. 4 e = Glucose-6-phosphat, Abb. 4 f = Gluconat-6-phosphat.

Abb. 5 prozentuale Abspaltung von anorganischem Phosphat aus Phosphorsäureestern mittels alkalischer Phosphatase (0,4 U/Ansatz) im zeitlichen Verlauf. Mittelwerte aus 4 Inkubationen je Zeitabschnitt und Substrat.

Verwendete Substrate:



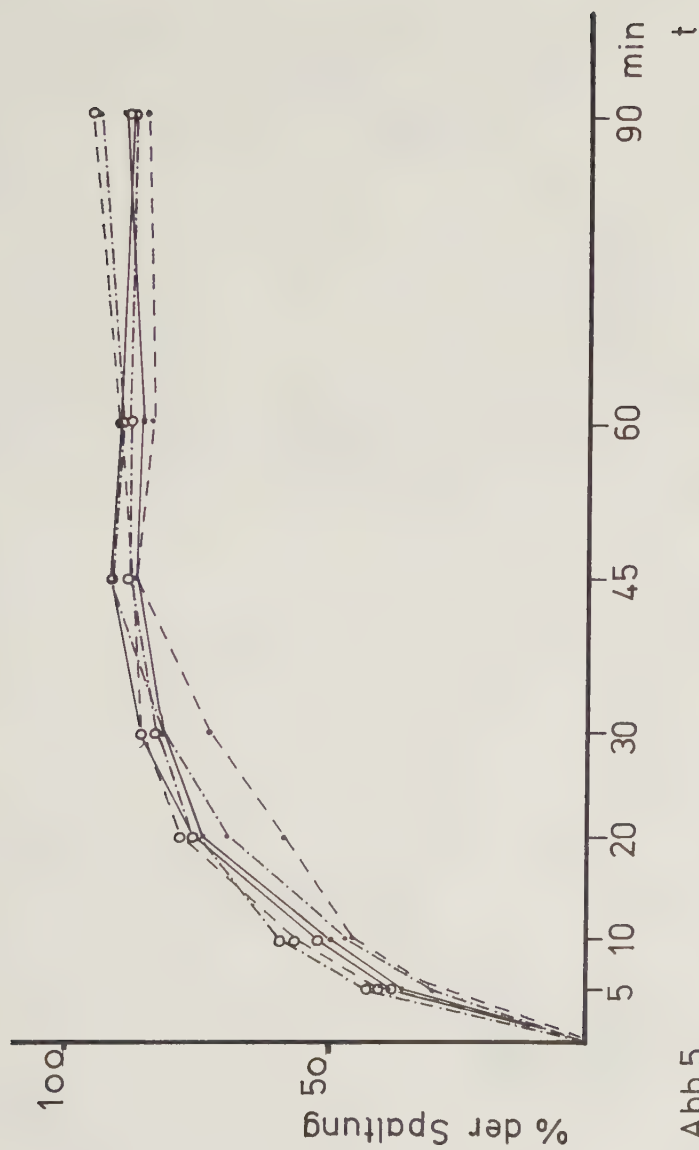


Abb.5

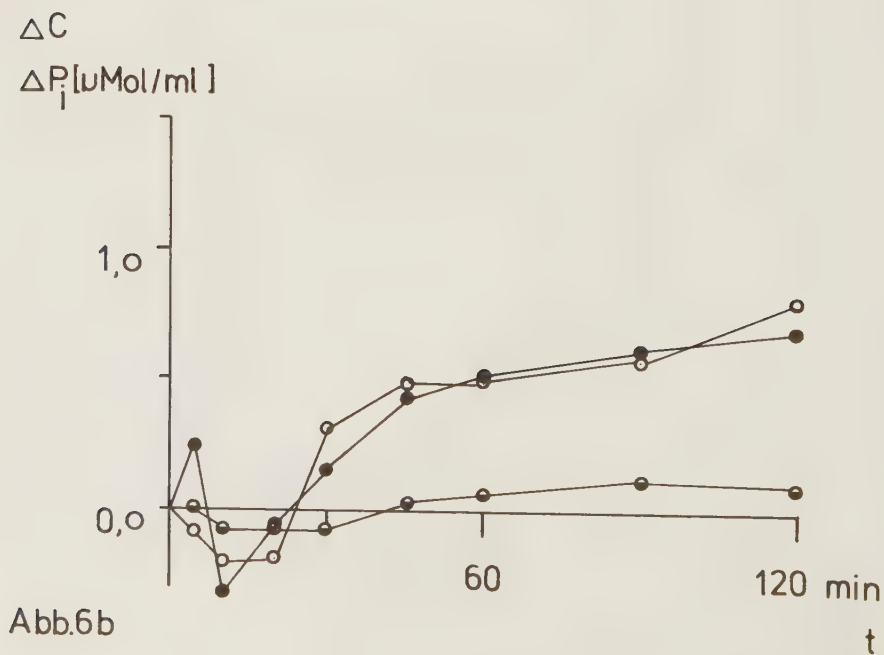
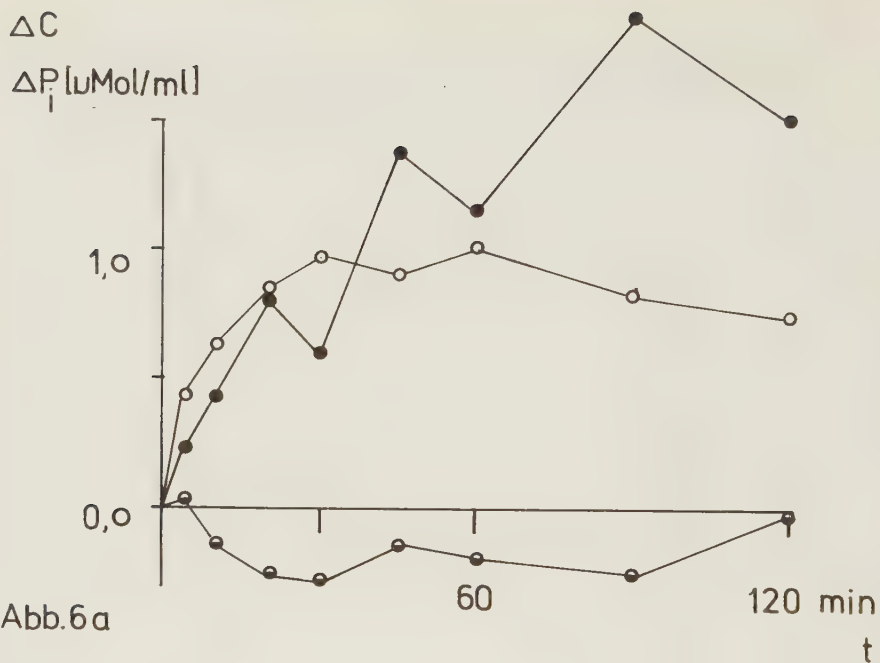


Abb. 6 a - d

Anorganisches Phosphat im Blut unter Infusion von Fructose, DL-Glycerin-3-phosphat oder einem Gemisch aus beiden Substanzen. Dargestellt ist die Änderung des anorganischen Phosphates im Blut gegenüber dem Ausgangswert in $\mu\text{Mol/ml}$ Blut

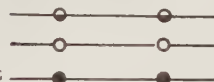
Verwendete Dosierungen:	an Fructose	an DL-Glycerin-3-phosphat
bei Versuch in Abb. 6 a	$1,5 \text{ g.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$	$0,7 \text{ g.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$
bei Versuch in Abb. 6 b	$1,5 \text{ g.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$	$0,14 \text{ g.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$
bei Versucht in Abb. 6 c	$2,5 \text{ g.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$	$0,07 \text{ g.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$

Das infundierte Volumen betrug $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$

Markierungen: Fructose

DL-Glycerin-3-phosphat

Fructose mit DL-Glycerin-3-phosphat



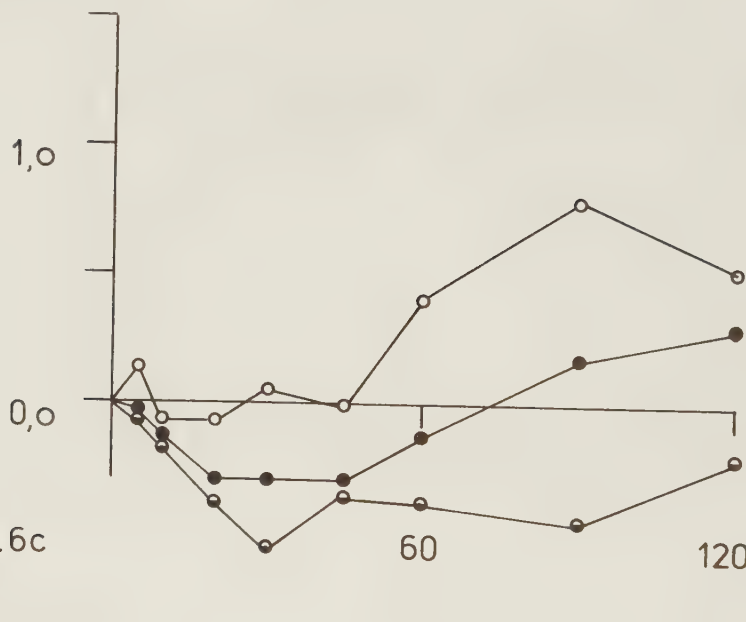
ΔC $\Delta P_i [\mu\text{Mol/ml}]$ 

Abb. 6c

Abb. 7

Anorganisches Phosphat im Blut unter Infusion von Fructose, DL-Glycerin-3-phosphat und einem Gemisch aus beiden Substanzen nach vorheriger Infusion von DL-Glycerin-3-phosphat bzw. physiologischer Elektrolytlösung.

Dargestellt ist die Änderung des anorganischen Phosphates im Blut gegenüber dem Ausgangswert (O_2 -Wert wie in Tab. 4)

Vorangestellt sind die Absolutwerte des anorganischen Phosphates im Blut in $\mu\text{Mol/ml}$ zur Zeit O_1 (vor Beginn der Vorinfusion)

Markierungen: wie in Abb. 6

Abb.7

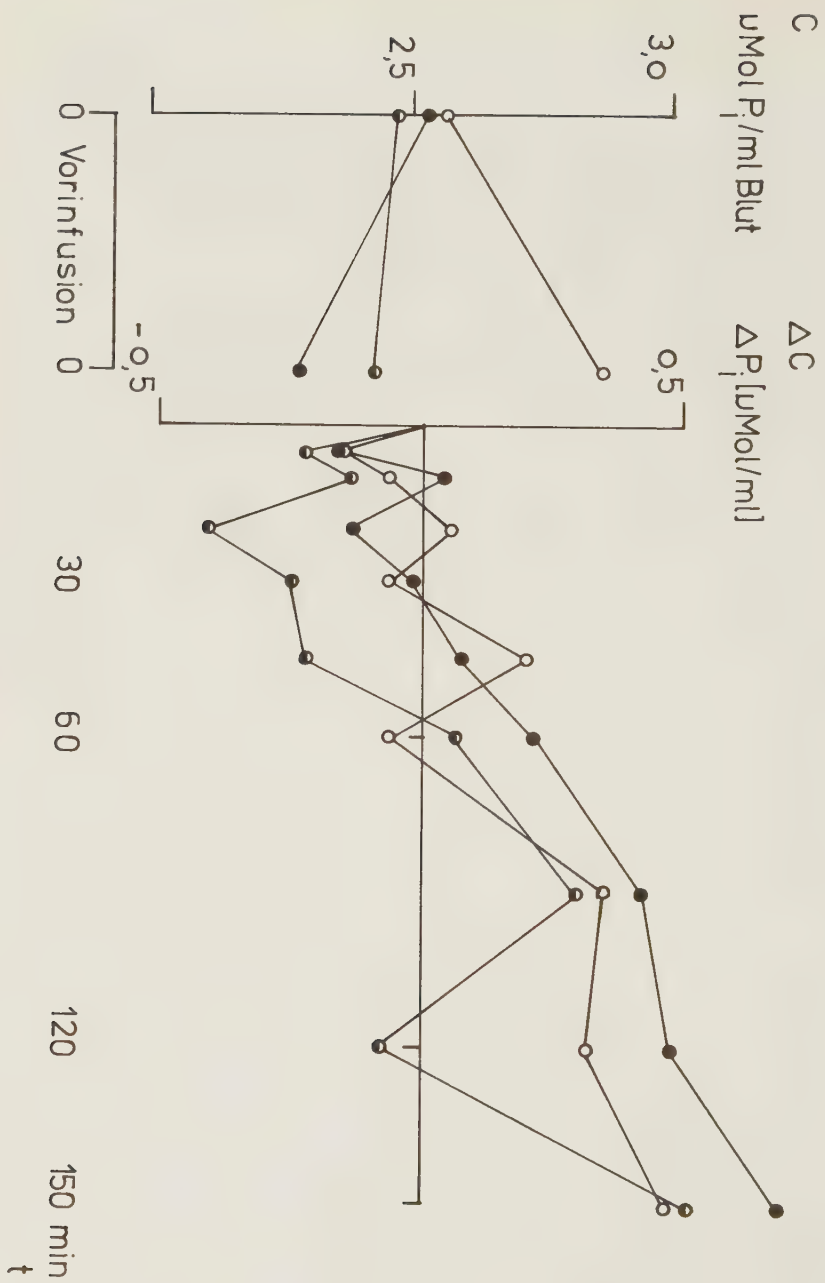


Abb. 8 a - c

Mittelwerte und Streubereich des anorganischen Phosphates im Blut unter Infusion von Fructose, DL-Glycerin-3-phosphat bzw. einem Gemisch aus beiden Substanzen nach vorheriger Infusion von DL-Glycerin-3-phosphat bzw. Elektrolytlösung.

Dargestellt sind sowohl die Absolutwerte (1. Ordinate) in $\mu\text{Mol}/\text{ml}$ wie auch die Änderung des anorganischen Phosphates im Blut gegenüber dem O_2 -Wert.

in $\mu\text{Mol}/\text{ml}$

Dosierung

Bei Versuch in Abb.	Fructose	DL-Glycerin- 3-phosphat	Vorinfusion mit
8 a	$2,5 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$	-	Elektrolytlösung
8 b	$2,5 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$	$0,07 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$	DL-Glycerin-3-phosphat
8 c	-	$0,07 \text{ g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$	DL-Glycerin-3-phosphat

Es wurde ein Volumen von $1,2 \text{ ml.h}^{-1}$ infundiert. Die Vorinfusionen enthielten die gleichen Mengen der Substanz pro kg und h wie die Hauptinfusion.

C

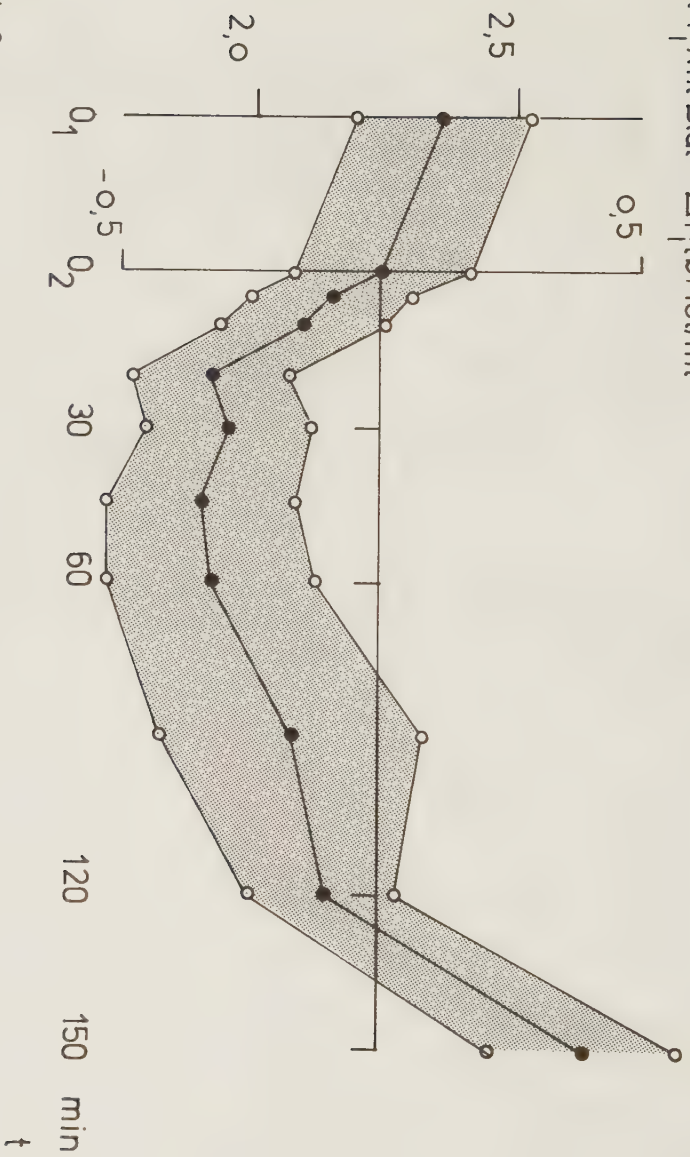
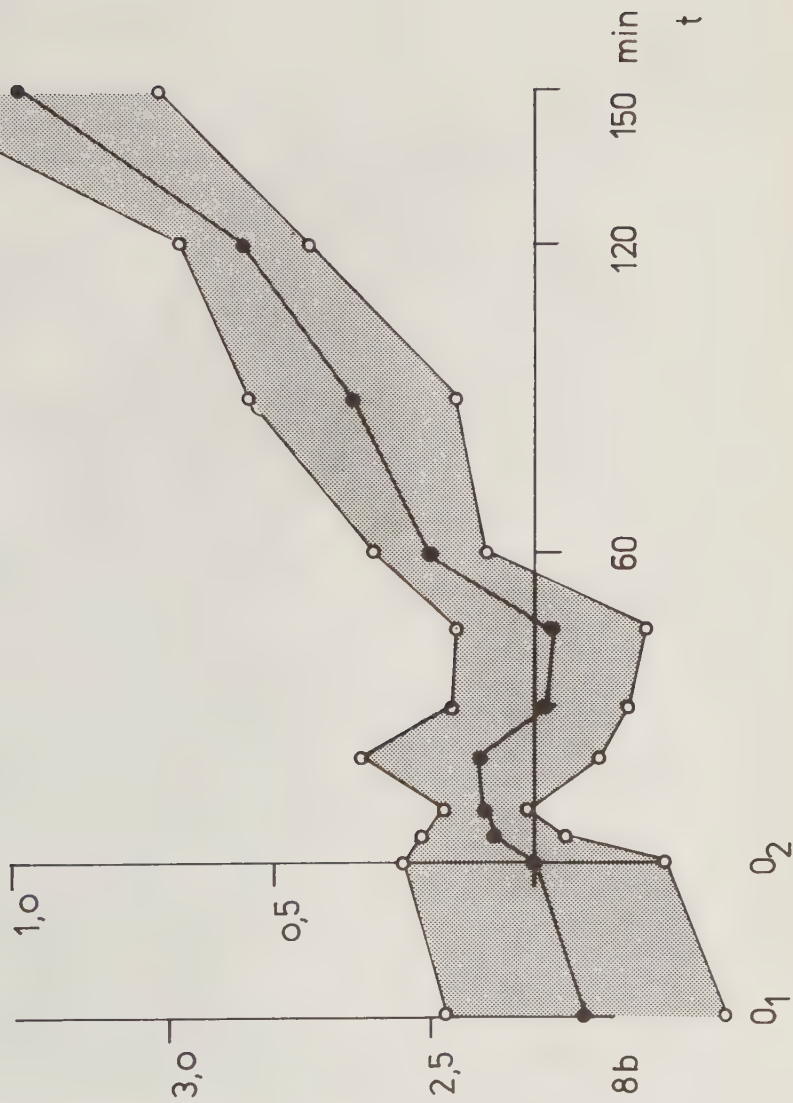
 ΔC $\mu\text{Mol } P_i/\text{ml Blut}$ $\Delta P_i [\mu\text{Mol}/\text{ml}]$ 

Abb. 8a

C ΔC
 $\mu\text{Mol P}_i/\text{ml Blut } \Delta P_i [\mu\text{Mol/ml}]$



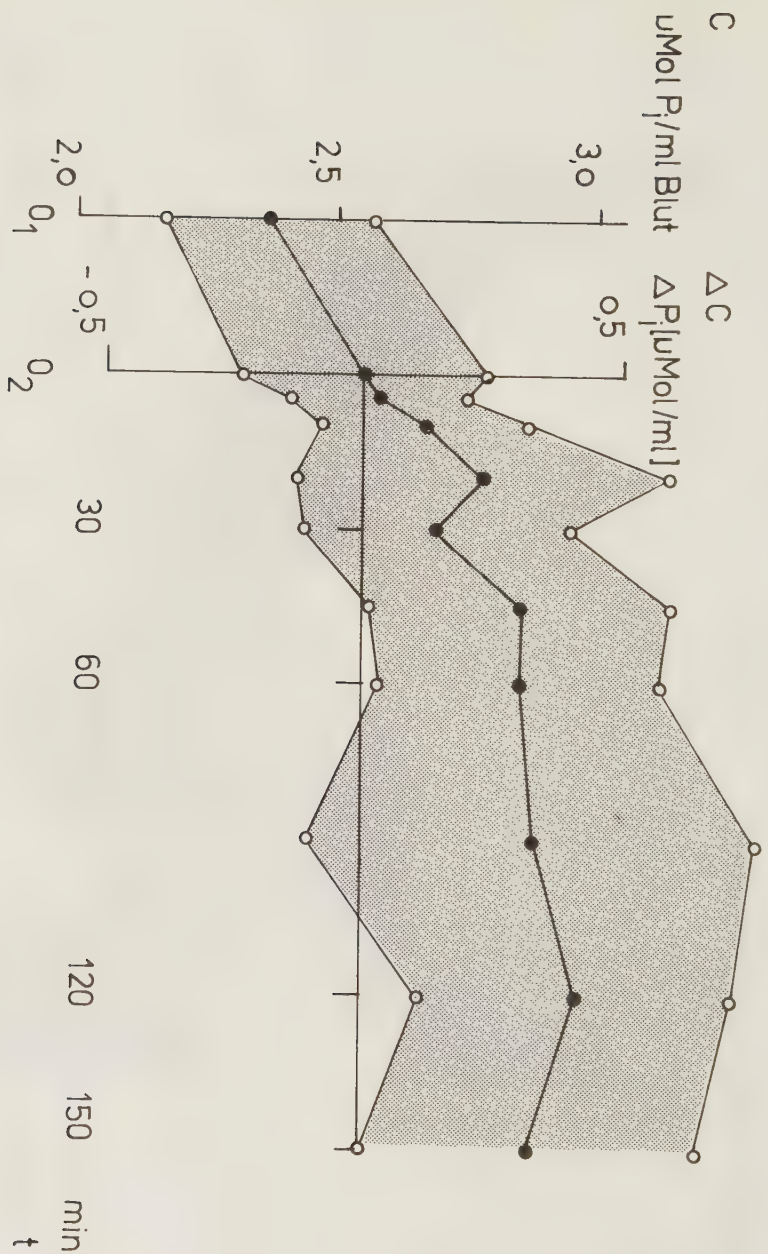


Abb. 8c

Literaturverzeichnis

1. P.H. Mäenpää, K.O. Raivio, M.P. Kekomäki
Liver Adenine Nucleotides: Fructose-Induced Depletion
and its Effect on Protein Synthesis
Science 161, 1253-1254 (1968)
2. K.O. Raivio, M.P. Kekomäki, P.H. Mäenpää
Depletion of Liver Adenine Nucleotides Induced by
D-Fructose
Biochem. Pharmacol. 18, 2615-2624 (1969)
3. H. Brinkrolf, K.H. Bässler
The adenine nucleotid content of rat liver during
infusions of carbohydrates and polyols
Ernährungsw. 2, 167-172 (1972)
4. H.F. Woods, L.V. Eggleston, H.A. Krebs
The Cause of Hepatic Accumulation of Fructose 1-phosphate
on Fructose Loading
Biochem. J. 119, 501-510 (1970)
5. J.Ch. Bode, O. Zelder, H.J. Rumpelt, U. Wittkamp
Depletion of Liver Adenosine Phosphates and Metabolic
Effects of Intravenous Infusion of Fructose or Sorbitol
in Man and in the Rat.
Europ. J. clin. Invest. 3, 436-441 (1973)
6. J.Ch. Bode, H. Schumacher, H. Goebell, O. Zelder, H. Pelzel
Fructose Induced Depletion of Liver Adenine Nucleotides
in Man
Horm. Metab. Res. 3, 289-290 (1971)
7. J. Parheentupa, K.O. Raivio
Fructose-Induced Hyperuricaemia
Lancet, 2, 528-531 (9. September 1967)

8. E.R. Froesch, H.P. Wolf, H. Baitsch
Hereditary Fructose Intolerance
Amer. J. Med. 34, 151-167 (1963)
9. P.U. Heuckenkamp, K. Hagen, U. Mahrenholz, N. Zöllner
Vergleichende Untersuchungen des Harnsäure- und Phosphat-
spiegels bei Gesunden und Patienten mit manifester Gicht
während mehrstündiger i.v. Fructosezufuhr.
Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 78, 1326-1329 (1971)
10. H. Haacke, R. Boos, L. Weisbecker
Der intravenöse Glucosetoleranztest und der intravenöse
Glucosecortisoltoleranztest in Verbindung mit dem Ver-
halten des anorganischen Serumphosphates
Ärztl. Forsch. 3, 95-100, (1969)
11. D.G. Corredor, G. Sabeh, L.V. Mendelsohn, R.E. Wasserman,
J.H. Sunder, T.S. Danowski
Enhanced Postglucose Hypophosphatemia During Starvation
Therapy of Obesity
Metabolism, 18 No. 9, 754-763 (1969)
12. Anonym
Fatal hyperalimentation syndrome
Nutr. Rev. 30, 121-125 (1972)
13. H.P. Wolf, W. Queisser, K. Beck
Der initiale Phosphatabfall im Serum von Gesunden und
Leberkranken nach intravenöser Verabreichung von
Hexosen und Zuckeralkoholen
Klin. Wschr. 47/2, 1084-1086 (1969)
14. P.A. Boelens, W. Norwood, C. Kjellstrand, D.M. Brown
Hypophosphatemia with Muscle Weakness due to Antacids
and Hemodialysis
Amer. J. Dis. Child. 120, 350-353 (1970)
15. S.F. Travis, H.J. Sugerman, R.L. Ruberg, S.J. Dudrick,
M. Delivoria-Papadopoulos, L.D. Miller, F.A. Oski
Alterations of Red-Cell Glycolytic Intermediates and
Oxygen Transport as a Consequence of Hypophosphatemia
in Patients Receiving Intravenous Hyperalimentation
New. Engl. J. Med. 285, 763-768 (1971)

16. E. Eisenberg
Effect of i.v. phosphate on serum strontium and calcium
New. Engl. J. Med. 282, 889-892 (1972)
17. R.W. Cavey, G.W. Schmitt, H.H. Kopald
Massive Extraskeletal Calcification During Phosphate
Treatment of Hypercalcaemia
Arch. intern. Med. 122, 150-155 (1968)
18. R.G. Latimer, V.L. Rees
Hypercalcaemic Crisis Treatment with Inorganic Phosphate
Solution
Amer. J. Surg. 116, 669-673 (1968)
19. G.O. Thomas
Hypercalcaemia in Sarcoidosis Treated with Inorganic
Phosphate
Brit. Med. J. 1969/2, 96-98 (1969)
20. E. Bernt, H.U. Bergmeyer
H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, Bd II
Verl. Chemie, Weinheim Bergstr. II. 2.Aufl. 1266-1269
(1970)
21. Documenta Geigy-Wissenschaftliche Tabellen
Ausgabe 1955
22. R. Richterich
Klinische Chemie, Theorie und Praxis
Akadem. Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M.
2. erweiterte Aufl. (1968)
23. F.H. Dost
Grundlagen der Pharmakokinetik
2. erweiterte und umgearbeitete Auflage
Thieme Verlag Stuttgart, (1968)

24. J. van Stevenick
The Mechanism of Transmembrane Glucose Transport in Yeast:
Evidence of Phosphorylation, associated with Transport
Arch. Biochem. 130, 244-252 (1969)
25. G.W. Dietz, L.A. Heppel
Studies on the Uptake of Hexose-Phosphate: I-III
J. biol. Chem. 246, 2881-2897 (1971)
26. E. Cotchin, F.J.C. Roe
Pathology of Laboratory Rats and Mice
Blachwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh
(1967)
27. R.G. Narins, J.S. Weisberg, A.R. Myers
Effect of Carbohydrates on Uric Acid Metabolism
Metabolism 23 No. 5, 455-465 (1974)
28. F. Heinz, J. Junghänel
Metabolitmuster in Rattenleber nach Fructoseapplikation
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 859-866 (1969)
29. K.H. Bässler, H. Bickel
The Use of Carbohydrates Alone and in Combination with
Parenteral Nutrition pp. 99-104
A.W. Wilkinson, Parenteral Nutrition
Churchchill Livingstone, Edinburgh-London (1972)
30. K.H. Bässler
Probleme der Kohlenhydratanwendung in der parenteralen
Ernährung
Wissenschaftliche Informationen Fresenius
"Anaesthesie, Wiederbelebung, Intensivbehandlung" 4, (1973)
31. H. Sahebjam, R. Scalettar
Effects of Fructose Infusion on Lactate and Uric
Acid Metabolism
Lancet, 1, 366-369 (20. February 1971)

32. D. Zakim, R.H. Herman
The Effect of Intravenous Fructose and Glucose on
the Hepatic -Glycerophosphate Concentration in the Rat
Biochim. biophys. Acta 144, 242-251 (1968)
33. J.D. Schwarzmeier, W. Marktl, K. Moser, A. Lujf
Fructose Induced Hyperuricemia:
Effects of Fructose on the de novo Synthesis of Adenine
Nucleotides in the Liver and skeletal Muscles of Rats
Res. exp. Med. 162, 341-346 (1974)
34. P.U. Heuckenkamp, N. Zöllner
Fructose-Induced Hyperuricemia
Lancet, 1, 808-809 (17. April 1971)
35. H. Förster
Sind bei Infusionen von Zuckeraustauschstoffen echte
Nebenwirkungen zu erwarten?
Dtsch. med. Wschr. 98, 839-844 (1973)
36. H. Förster, E. Meyer, M. Ziege
Erhöhung von Serumharnsäure und Serumbilirubin nach
hochdosierten Infusionen von Sorbit, Xylit und Fructose
Klin. Wschr. 48, 878-879 (1970)
37. H. Förster, St. Becker, M. Ziege
Anstieg der Konzentration der Serumharnsäure nach
akuter und chronischer Zufuhr von Saccharose, Fructose,
Sorbit und Xylit
Med. Ernähr. 13, 193-196 (1973)
38. J. Costello, T.G. Brady
Adenylate-Deaminase Activity in a Number of Species
Biochem. J. 119/3, 6 p (1970)
(Proceedings of the Biochemical Society).

39. H. Theile, E. Strack, D. Biesold
Dauerinfusion von Fructose und Glycerin am Kaninchen
und ihr Einfluß auf die Glucose im Blut
Z. ges. exp. Med. 133, 410-422 (1960)
40. P.J. Goldblatt, H. Witschi, M.A. Friedmann, R.J. Sullivan,
K.H. Shull
Some Structural and Functional Consequences of Hepatic
Adenosine Triphosphate Deficiency Induced by Intraperi-
toneal D-Fructose Application
Lab. Invest. 23 No. 4, 378-385 (1970)
41. K.H. Bössler, G. Stein
Biochemische Grundlagen für Wirkungsunterschiede
zwischen Sorbit und Fructose
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 533-539 (1967)
42. W. Thorn, E.W. Busch, A. Philippu, F. Liemann
ATP-, ADP-, Pyruvat- und Lactatgehalt in Blut und Leber
nach intravenöser Fructose- und Mannosebelastung
Pflügers Arch. ges. Physiol. 272, 490-506 (1960)
43. M. Kekomäki, R. Collan, O. Lindfors, K.O. Raivio
Postoperative Alimentation with Fructose and Glucose
Acta Chir. Scand. 138, 245-249 (1972)
44. A. Beloff-Chain, E.B. Chain, D. Bovet, F. Pocchiari,
R. Catanzaro, L. Longinotti
Metabolism of Hexose Phosphate Esters
Biochem. J. 54, 529-539 (1953)
45. A. Beloff-Chain, P. Betto, R. Catanzaro, E.B. Chain,
L. Longinotti, I. Masi, F. Pocchiari
The Metabolism of Glucose-1-phosphate and Glucose-
6-phosphate and their Influence on the Metabolism of
Glucose in Rat-Diaphragm Muscle
Biochem. J. 91, 620-624 (1964)

46. D. Tirunareyanan
Investigations on the Enzymes and Toxines of Staphylococci
Acta pathol. microbiol. Scand. 75, 125-138 (1970)
47. J. Riehl
Zur Spezifität der Phosphatasen: Zum Reaktionsmechanismus
der Hydrolyse von Phosphorsäureestern durch tierische
Phosphatasen
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 318, 138-147 (1960)
48. H.N. Fernley, P.G. Walker
Studies on Alkaline Phosphatase: Inhibition by Phosphate
Derivates and Substrate Specificity
Biochem. J. 104, 1011-1018 (1967)
49. H. Neumann
Substrate Selektivität in the Action of Alkaline and
Acid Phosphatase
J. biol. Chem. 243/18, 4671-4676 (1968)
50. G. Siebert, K. Kesselring, F. Fischer
Phosphoenolpyruvat als Substrat der alkalischen
Phosphatase: Konkurrenz mit Pyruvatkinase
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, 44-75 (1965)
51. W. Prellwitz
Klinisch-Chemische Diagnostik
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1972)
52. R.H. Ackermann, K.H. Bäßler, K. Wagner
The Relation between the Blood-Level of a Substrate and
Enzyme Kinetics Studied with Glycerol in the Rat.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. chem. 355, 576-582 (1974)

Lebenslauf

Geburt: 30. Januar 1948
Geburtsort: Bergzabern (Pfalz)
Eltern: Dr. med. Eduard Hassinger, praktischer Arzt
und Ehefrau Wiltrude, geb. Huber
Familienstand: ledig
Schulausbildung: 1954 - 1958 Volksschule Bergzabern
1958 - 1966 staatliches Progymnasium,
später Staatliches Neusprachli-
ches Gymnasium Bergzabern
26.10.1966 Abitur
Studium: WS 1966/67 Studium der Chemie, Biologie und
Mathematik an der Technischen
Hochschule Karlsruhe
1967 Zulassung zum Studium der Medizin
an der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz
SS 1967 -
SS 1972 Studium der Medizin an der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
März 1968 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
für Mediziner
Oktober 1969 Ärztliche Vorprüfung
Dezember 1972 Ärztliche Prüfung
Ärztliche Tätigkeit: Mai 1973 - Juni 1974 Medizinalassistent an
der I. Medizinischen Klinik und der Chirur-
gischen Klinik der Universitätskliniken
Mainz sowie in der Landpraxis von Dr. med.
E. Hassinger.
30. April 1974 Approbation als Arzt
seit 1. Juli 1974 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut
für Physiologische Chemie der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz (Prof. Dr. K.H.
Bäßler)

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit vom 1. 7. 74
bis SS 1975.

